

Aus dem Pharmakologischen Institut  
Direktor: Prof. Dr. Robert Grosse  
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Bedeutung der Formine FMNL1, 2 und 3 für die  
Invasivität und das Wachstum von Melanomzellen *in vitro*  
und *in vivo***



**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Maria Hauswald**

aus Cottbus

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 18.04.2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Herr Prof. Dr. H. Schäfer
Referent:	Herr Prof. Dr. F. Czubayko
1. Korreferent:	Herr PD Dr. H. Garn

*Diese Arbeit widme ich meinen über alles geliebten Eltern  
und meinem Verlobten Sebastian.*

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis .....	3
Zusammenfassung .....	4
Summary.....	6
1. Einleitung .....	8
1.1 Das Aktinzytoskelett.....	8
1.1.1 Formine als Aktinnukleatoren .....	10
1.1.2 Regulierung der Forminaktivität .....	15
1.1.3 Organisation Aktin-basierter Zellfortsätze.....	16
1.2. Organisation des Aktinzytoskeletts bei der Zellmigration.....	18
1.2.1 Das Zytoskelett und Zell-Matrix-Adhäsionen.....	20
1.2.2 Rolle der Formine FMNL1-3 in malignen Erkrankungen .....	21
1.3. Regulation des Transkriptionsfaktors SRF durch Aktin .....	24
1.4 Melanom .....	27
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	29
2. Material und Methoden .....	30
2.1 Material .....	30
2.1.1 Expressionsvektoren.....	37
2.2. Biochemische Methoden.....	38
2.2.1 Ko-Immunpräzipitation .....	38
2.2.2 Nukleäre und zytoplasmatische Fraktionierung.....	38
2.2.3 SDS-PAGE und Western Blot.....	38
2.3. Molekularbiologische Methoden .....	40
2.3.1 RNA-Isolation mit Trizol .....	40
2.3.2 Reverse Transkription der gesamt-RNA .....	40
2.3.3 Quantitative Real Time PCR (qPCR) .....	40
2.4. Zellbiologische Methoden .....	41
2.4.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen .....	41
2.4.2 Transfektion von Zellen .....	42
2.4.3 Generierung stabiler Zelllinien.....	43
2.4.4 Wachstumsassays .....	44
2.4.5 Apoptose-Assay .....	46
2.4.6 Durchflusszytometrische Analysen.....	47
2.5. Dreidimensionale Invasionsexperimente .....	48

2.5.1 Matrigel-Migrationsstudien.....	48
2.5.2 Kollagen-Invasionsexperimente.....	49
2.6. Mikroskopie .....	50
2.6.1 Lebendzellmikroskopie .....	50
2.6.2 Konfokale Mikroskopie.....	51
2.7 Reportergeranalysen.....	51
2.8 Histologie.....	52
2.9 Statistische Auswertung.....	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1 Die Bedeutung von FMNL1-3 für die Invasivität von Melanomzellen.....	54
3.1.1 Expression von FMNL1-3 in humanen Melanomzelllinien.....	54
3.1.2 FMNL2 reguliert die Invasionsfähigkeit von Melanomzelllinien.....	57
3.2 Charakterisierung der Bedeutung von FMNL1-3 für die Proliferation von Melanomzelllinien .....	62
3.2.2 FMNL2 und FMNL3 beeinflussen das Adhäsions-unabhängige Wachstum. 65	
3.3 Funktionelle Bedeutung von FMNL2 und FMNL3 für die Ausbildung und das Wachstum von Tumoren.....	69
3.3.1 FMNL2- oder FMNL3-Expressionsverminderung reduziert die Bildung subkutaner Tumore.....	69
3.3.2 Die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 verringert das Wachstum etablierter Tumore. ....	71
3.4 Ursachen für die verringerte Proliferation nach FMNL2- und FMNL3-Expressionsverminderung.....	74
3.4.1 FMNL2 und FMNL3 beeinflussen den Ablauf des Zellzyklus.....	75
3.4.2 FMNL2 und FMNL3 sind bedeutend für die Integrität fokaler Adhäsionen. 78	
3.4.3 Die Runterregulierung von FMNL1-3 beeinflusst nicht den MAP-Kinase-Signalweg. ....	82
3.5 Hetero-Dimerisierung von FMNL2 und FMNL3 .....	84
3.6 Der Einfluss von FMNL1-3 auf den MAL-SRF-Signalweg .....	87
3.6.1 Die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 beeinflusst die subzelluläre Verteilung von MAL. ....	87
3.6.2 Die Runterregulierung von FMNL1-3 beeinflusst nicht die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF. ....	89
3.6.3 Rettung der durch FMNL-Runterregulierung bedingten Effekte durch konstitutiv aktives MAL.....	90
4. Diskussion .....	95
4.1 FMNL2 reguliert die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen. ....	95
4.2 FMNL2 und FMNL3 regulieren die Proliferation von Melanomzellen. ....	100

4.3 FMNL2 und FMNL3 bilden Hetero-Dimere in Melanomzellen. ....	109
Literaturverzeichnis .....	114
Anhang .....	123
Verzeichnis akademischer Lehrer .....	123
Danksagung .....	124

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Regulation des Aktin „treadmilling“ .....	9
Abb. 2: Assemblierung von F-Aktin durch den Arp2/3-Komplex und durch Formine .	10
Abb. 3: Domänenstruktur, Autoinhibition und Aktin-Polymerisation durch Formine ..	13
Abb. 4: Zyklus der Rho-GTPasen .....	15
Abb. 5: Schematische Darstellung von Lamellipodien und Filopodien.....	17
Abb. 6: Zellmigration ist abhängig von verschiedenen Aktinfilamentstrukturen. ....	19
Abb. 7: Migration von Zellen.....	20
Abb. 8: Aktin-vermittelte Regulierung der MAL-SRF-abhängigen Transkription.....	26
Abb. 9: Lentivirales Vektorsystem pInducer20.....	44
Abb. 10: Umsetzung des Caspase 3/7 Substrats.....	46
Abb. 11: Matrigel- <i>Transwell</i> -Migrationsassay.....	49
Abb. 12: Kollagen-Invasionsexperiment.....	50
Abb. 13: Expressionsanalysen von FMNL1-3 in Melanomzelllinien .....	56
Abb. 14: WM278-Melanomzellen mit verminderter FMNL2-Expression zeigen reduzierte Invasivität im Matrigel. ....	58
Abb. 15: Runterregulierung von FMNL2 reduziert die Migrationsgeschwindigkeit von LOX-Zellen. ....	60
Abb. 16: Effizienz der siRNA-vermittelten Runterregulierung von FMNL1-3 in MV3- Zellen .....	63
Abb. 17: Wachstum von MV3-Zellen nach siRNA-vermittelter einzelner und kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3.....	64
Abb. 18: Wachstum von MV3-Zellen mit stabiler shRNA-vermittelter Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 .....	66
Abb. 19: Wachstum von LOX-Zellen mit stabiler shRNA-vermittelter Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 .....	67
Abb. 20: Adhäsions-unabhängiges Wachstum shRNA exprimierender LOX-Zellen auf Zellkulturplatten mit einer ultra-low attachment Oberfläche .....	68
Abb. 21: <i>In vivo</i> Experimente mit FMNL2- und FMNL3-shRNA-exprimierenden LOX- Zellen .....	70
Abb. 22: Wachstum etablierter MV3-Tumore nach systemischer Behandlung mit PEI/siRNA-Komplexen .....	72

Abb. 23: PCNA- und Hämalan-Färbung der Tumore .....	73
Abb. 24: Adhäsions-unabhängiges Wachstum von MV3-Zellen mit FMNL- Expressionsverminderung auf einer ultra-low attachment Oberfläche .....	75
Abb. 25: Effekt der FMNL-Runterregulierung auf den Verlauf des Zellzyklus .....	76
Abb. 26: Expression der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und CDK4 in MV3-Zellen .....	78
Abb. 27: Vinculin-Verteilung in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression ....	79
Abb. 28: Expression von Integrin $\beta$ -1 (ITGB1) auf der Oberfläche von MV3-Zellen ..	80
Abb. 29: Phosphorylierung der <i>focal adhesion kinase</i> (FAK) in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression .....	82
Abb. 30: Phosphorylierung der MAP-Kinase (MAPK) in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression .....	83
Abb. 31: FMNL2 interagiert mit FMNL3 in MV3-Zellen .....	85
Abb. 32: Verteilung des endogenen MAL bei kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 in MV3-Zellen .....	88
Abb. 33: SRF-abhängige Reportergenanalyse.....	90
Abb. 34: Effekt der MAL-Überexpression in MV3-Zellen nach FMNL- Runterregulierung auf die Kolonienausbildung im Soft-Agar .....	92
Abb. 35: Vinculin-Verteilung an FAs nach MAL-Überexpression und kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3.....	94



## Abkürzungsverzeichnis

DAD	<i>Diaphanous</i> -autoregulatorische Domäne
DID	<i>Diaphanous</i> -inhibitorische Domäne
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	fokale Adhäsion
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fetales Kälberserum
FMNL1	<i>Formin-like 1</i>
FMNL2	<i>Formin-like 2</i>
FMNL3	<i>Formin-like 3</i>
GAP	GTPase <i>activating</i> Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GBD	GTPase-Bindedomäne
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange</i> Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HDAC	Histon-Deacetylase
ITGB1	Integrin $\beta$ -1
kD	Kilodalton
M	Molar
MAL (MRTF-A)	<i>Megakaryocytic acute leukemia (myocardin related</i> Transkriptionsfaktor-A)
mDia	<i>mammalian Diaphanous</i>
min	Minute
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>

## Zusammenfassung

Aktinfilamente sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts in Eukaryonten. Für zahlreiche essentielle zelluläre Prozesse wie die Migration, die Adhäsion, den intrazellulären Vesikeltransport und die Zytokinese ist der zielgerichtete, rasche Auf- und Abbau von Aktinfilamenten unerlässlich. Eine wichtige Rolle bei der Assemblierung dieser Filamente spielen Aktinnukleatoren, zu denen unter anderem Formine wie FMNL1-3 zählen.

Bei Tumorerkrankungen wie dem malignen Melanom stellt die Metastasierung des Primärtumors eine der Haupttodesursachen dar. Dabei ist für das Wachstum des Tumors und dessen Metastasen neben der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen auch ihre Fähigkeit, an die extrazelluläre Matrix (EZM) zu binden, von entscheidender Bedeutung. Da diese beiden Prozesse durch das Aktinzytoskelett beeinflusst werden, ist die Untersuchung einer diesbezüglichen Formin-Abhängigkeit besonders interessant.

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich lediglich auf den Einfluss von FMNL2 auf die Invasivität von Zellen. Daher war es Gegenstand dieser Arbeit, den Einfluss von FMNL1-3 auf die Invasivität und besonders auf das Zellwachstum in humanen Melanomzelllinien zu analysieren.

Anhand von siRNA- oder shRNA-vermittelter Expressionsverminderung von FMNL1-3 in zwei invasiven Melanomzelllinien WM278 und LOX konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich FMNL2 die Invasivität der Zellen beeinflusst.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* eine deutliche Abhängigkeit des Adhäsions-unabhängigen Wachstums der Zellen von FMNL2 und besonders FMNL3 gezeigt werden. In Mausstudien konnten wir zudem einen Einfluss von FMNL2 und FMNL3 auf das Tumorstadium sowie die Ausbildung von MV3- und LOX-Zell-Tumoren nachweisen.

Weitere Untersuchungen dieser Zellen zeigten ein Defizit im Ablauf des Zellzyklus. Dies äußerte sich in einem beeinträchtigten Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase, was zu einem erhöhten Zell-Anteil in der G<sub>1</sub>-Phase führte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl fokaler Adhäsionen und somit die Interaktion zwischen Zelle und EZM durch FMNL2 und FMNL3 beeinflusst wird. Bei allen Untersuchungen war der Effekt einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 am stärksten, was auf eine redundante Funktion dieser beiden Formine hinweist. Um starke Effekte z.B. auf die

Proliferation zu erzielen, muss daher eine gewisse Schwellenkonzentration beider FMNLs unterschritten werden. Dies könnte durch die von uns nachgewiesene Hetero-Dimerisierung von FMNL2 und FMNL3 bedingt sein.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass sowohl FMNL2, neben seiner Bedeutung für die Invasivität von Melanomzellen, als auch FMNL3 eine bedeutende Rolle für das Wachstum von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* spielen. Dabei führt vermutlich die reduzierte Anzahl fokaler Adhäsionen nach FMNL2- und/oder FMNL3-Runterregulierung zu einer Beeinträchtigung des Zellzyklus und somit zu einem verminderten Zellwachstum.

## Summary

Actin filaments are crucial components of the eukaryotic cytoskeleton. The rapid, specific assembly and disassembly of actin filaments is essential for various cellular processes, i.e. migration, adhesion, intracellular vesicle transport and cytokinesis. Different actin nucleators, such as the formins FMNL1-3, play a major role in regulating these processes.

In many tumor diseases – such as malignant melanoma – metastasis is a main cause of death. Apart from the invasiveness of tumor cells, the capability of adhering to the extracellular matrix (ECM) is a crucial factor for tumor and metastatic growth. As both processes depend on the reorganization of the actin cytoskeleton, it is particularly interesting to investigate the role of formins in these events in human melanoma cells.

Current research mainly focused on the influence of FMNL2 on cancer cell invasion. Thus, the topic of this thesis was to investigate the effect of FMNL1-3 on cancer cell invasion and furthermore on cellular proliferation.

Using siRNA- and shRNA- mediated knockdown of FMNL1-3 in the two invasive melanoma cell lines WM278 and LOX, we show that mainly FMNL2 influences the invasiveness of cells.

Furthermore, FMNL2 and especially FMNL3 are necessary for anchorage-independent growth *in vitro*. Additionally, we demonstrate in mouse studies an effect of FMNL2 and FMNL3 on tumor initiation and growth of MV3 and LOX cells.

Further analysis of these cells showed a deficiency in cell cycle progression due to an impaired G<sub>1</sub>- to S-phase transition resulting in an enhanced percentage of cells in G<sub>1</sub>. Moreover we could show an influence of FMNL2 and FMNL3 on the number of focal adhesions, subsequently indicating an impaired cell-matrix interaction. In each analysis, a combined knockdown of FMNL2 and FMNL3 displayed the strongest effects, indicative of a redundant function of these two formins. Thus, the concentration of both proteins has to exceed a certain limit in order to obtain strong effects as a decrease in proliferation. This is likely due to a hetero-dimerization of FMNL2 and FMNL3, which we observed in co-immunoprecipitation and IP-mass spec studies.

Thus, our data show that FMNL2 and FMNL3 play important roles for the proliferation of melanoma cells *in vitro* and *in vivo*, in addition to their requirement for cancer cell

invasion. Presumably, the reduced amount of focal adhesions after FMNL2- and/or FMNL3 -knockdown impairs the cell cycle leading to a reduced proliferation.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Aktinzytoskelett

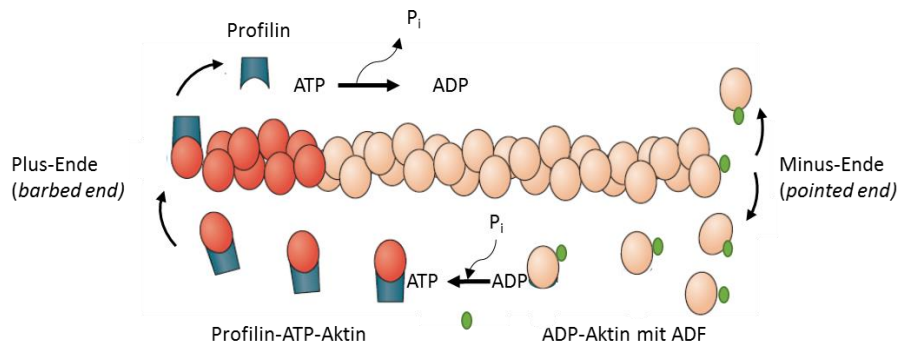
Das Zytoskelett ist ein wichtiges Gerüst der Zelle, welches ihr Struktur und Stabilität verleiht. Neben dieser formgebenden und stabilisierenden Funktion spielt es darüber hinaus eine essentielle Rolle bei der Migration, der Zytokinese und bei intrazellulären Transportprozessen (Fletcher and Mullins 2010). In eukaryotischen Zellen besteht das Zytoskelett aus drei Klassen von Filamenten: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktinfilamente.

Aktinfilamente stellen mit einem Durchmesser von 6-8 nm die dünnsten Filamente des Zytoskeletts dar (Heath and Dunn 1978), deren Netzwerk durch dynamische Polymerisation und Depolymerisation der einzelnen Filamente moduliert wird (Bugyi and Carlier 2010). Die gebildeten Aktinfilamente können durch Proteine gebündelt bzw. quervernetzt werden (Tseng et al. 2005) und stellen die Kernstrukturen zellulärer Fortsätze wie Filopodien, Mikrovilli (Derosier, Tilney, and Keck 2000) und Lamellipodien (Le Clainche and Carlier 2008) dar.

Das 42 kDa große Protein Aktin ist die Basis der doppelhelikalen Aktinfilamente, welche auch als filamentöses Aktin (F-Aktin) bezeichnet werden. Bei der Polymerisation der Filamente wird monomeres G-Aktin in die polymeren Aktinfilamente inkorporiert (Holmes et al. 1990). Die entstehenden Aktinfilamente weisen aufgrund der gerichteten Art ihrer Assemblierung eine polare Struktur auf. ATP-gebundenes G-Aktin wird am Plus-Ende (*barbed end*) des Stranges inkorporiert und das gebundene ATP nach der Polymerisation zu ADP hydrolysiert. Das somit am Minus-Ende (*pointed end*) des Filaments befindliche ADP-gebundene G-Aktin ermöglicht die dortige Depolymerisation (Begg, Rodewald, and Rebhun 1978; Le Clainche and Carlier 2008). Dieses Gleichgewicht von Polymerisation am Plus-Ende und Depolymerisation am Minus-Ende wird als *treadmilling* bezeichnet (Pollard and Borisy 2003) (Abb. 1).

*Capping* Proteine regulieren den Auf- und Abbau der Filamente, indem sie am Plus-Ende die Polymerisation (Kim, Cooper, and Sept 2010) und am Minus-Ende die Depolymerisation (Yamashiro et al. 2012; Holaska, Kowalski, and Wilson 2004) verhindern. So steigern beispielsweise die Proteine ADF (Aktin depolymerisierender Faktor) und Cofilin die Umsatzrate von Aktin, indem sie den Abbau der Filamente am Minus-Ende fördern (Theriot 1997). Andere Aktin-bindende Proteine wie Profilin dienen der Elongation von

Aktinfilamenten, indem diese bevorzugt Komplexe mit monomerem ATP-Aktin bilden, die anschließend am Plus-Ende des Filaments inkorporiert werden können (Pollard, Blanchoin, and Mullins 2000).



**Abb. 1: Regulation des Aktin „treadmilling“**

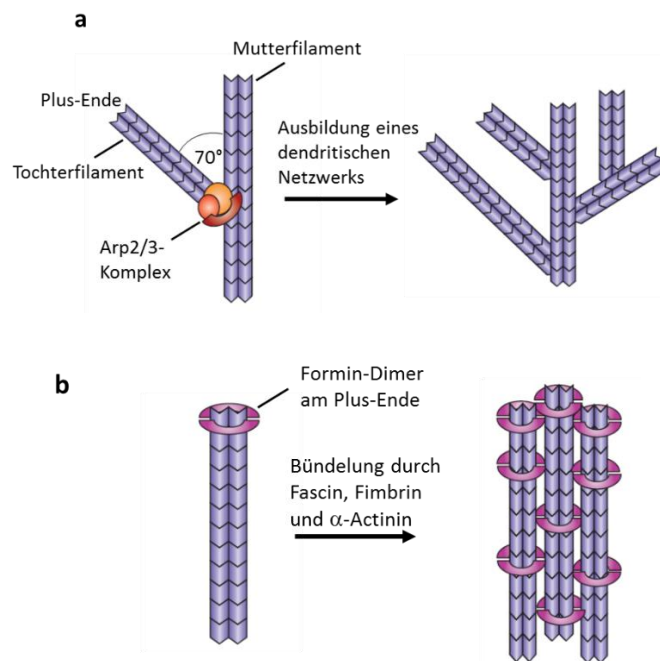
Aktinmonomere polymerisieren zu einem doppelhelikalen, polaren Aktinfilament. Profilin bindet an ATP-Aktinmonomere und fügt sie am Plus-Ende des Filaments ein. Durch die Hydrolyse des ATPs zu ADP wird das Filament destabilisiert und mit Hilfe von Proteinen wie ADF am Minus-Ende disassembliert. Durch Nucleotid-Austausch wird ADP-Aktin zu ATP-Aktin, welches wiederum von Profilin gebunden werden kann, um am Plus-Ende in das Filament eingebaut zu werden. (modifiziert nach (Witke 2004))

Da die Polymerisierung von Aktindi- und -trimeren (Nukleation) kinetisch ungünstig ist, werden für die Bildung von Aktinfilamenten Nukleatoren benötigt, die nach Aktivierung den Aufbau von Filamenten an bestimmten Orten der Zelle fördern (Chhabra and Higgs 2007). Bisher sind drei Klassen von Nukleatoren bekannt: der Arp2/3-Komplex, Formine und Spire. Sie erzeugen verschiedene Aktinfilamentstrukturen, was zur Ausbildung unterschiedlicher zellulärer Fortsätze wie Lamellipodien und Filopodien führt, die u.a. für die Zellmigration essentiell sind. Der dimere Arp2/3-Komplex lagert sich an bereits vorhandene Aktinfilamente an und erzeugt daran im 70°-Winkel ein Tochterfilament. Die so entstehenden verzweigten Aktinstrukturen bilden ein dendritisches Netzwerk und stellen das Grundgerüst von Lamellipodien dar (Abb. 2 a).

Formine hingegen sind in der Lage, 1. Filamente zu initiieren (Keimung), 2. lange, unverzweigte Aktinfilamente zu bilden und 3. diese teilweise selbst zu bündeln (Abb. 2 b). Die durch Proteine wie Fascin, Fimbrin und  $\alpha$ -Actinin (zusammen mit Myosin) gebündelten Aktinfilamente führen zur Formation von zellulären Strukturen wie Mikrovilli,

Stereozilien, Filopodien und kontraktile Stressfasern (Bretscher 1981; Vignjevic et al. 2006).

Durch Spire werden, ebenso wie durch Formine, unverzweigte Aktinfilamente assembliert, die anschließend durch Spire mit Mikrotubuli quervernetzt werden können (Chhabra and Higgs 2007).



**Abb. 2: Assemblierung von F-Aktin durch den Arp2/3-Komplex und durch Formine**

(a) Nach seiner Aktivierung fördert der Arp2/3-Komplex in einem Winkel von 70° die Bildung von Filamenten (Tochterfilament) an einem bereits existierenden Filament (Mutterfilament) und verbleibt dabei am Minus-Ende des neuen Filaments. Durch wiederholte Verzweigung entsteht ein dendritisches Netzwerk. (b) Formine können selbst Keimzentren initiieren und aus ihnen Filamente assemblieren, die durch sie selbst und andere Proteine wie Fascin, Fibrin und  $\alpha$ -Actinin gebündelt werden können. (modifiziert nach (Chhabra and Higgs 2007))

### 1.1.1 Formine als Aktinnukleatoren

Die Familie der Formine ist ubiquitär in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert und stellt die größte Gruppe unter den Aktinnukleatoren dar. Sie erfüllen komplexe und diverse Aufgaben in der Zelle und es wurde gezeigt, dass sie in auffallend vielen



zellulären Prozessen eine Rolle spielen: von der Regulierung des Zellzyklus (Mammoto et al. 2004) bis hin zur Distribution und Aufrechterhaltung von Zellorganellen (Minin et al. 2006; Colón-Franco, Gomez, and Billadeau 2011).

Formine sind für die Ausbildung einer Vielzahl von Aktinstrukturen in der Zelle verantwortlich, indem sie die Keimung neuer Aktinfilamente und deren Polymerisation modulieren. Dadurch regulieren sie unterschiedlichste zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Ausbildung des kontraktilen Rings bei der Zytokinese, die Aufrechterhaltung der Zellpolarität, die Ausbildung kontraktile Stressfasern bei der Zellmigration sowie den Vesikeltransport entlang der Aktinfilamente (Goode and Eck 2007). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Formine neben ihrer Fähigkeit der Aktinpolymerisation auch zur Stabilisierung und Organisation von Mikrotubuli beitragen (Goode and Eck 2007; DeWard and Alberts 2008; Kato et al. 2001; Thurston et al. 2012; Cheng et al. 2011).

Formine sind Multidomänen-Proteine, die sich durch die hoch konservierte FH2-Domäne definieren, welche direkt für den Aufbau von Aktinfilamenten verantwortlich ist. Analysen dieser Domäne führten zu einer Einteilung der 15 – in Säugetieren vorkommenden – Formine in 7 Gruppen (Goode and Eck 2007):

1. *Diaphanous* Formine (mDia1-3)
2. *Formin-related* Formine/*formin-like* (FMNL1-3)
3. *Disheveled-associated activators of morphogenesis* (DAAM 1-2)
4. *Formin homology domain-containing* Proteine (FHOD 1, 3)
5. *Delphinin*
6. *Inverted* Formine (INF1-2)
7. Formine (FMN1-2)

Neben der FH2-Domäne besitzen Formine weitere Domänen, die für ihre Regulierung sowie ihre Interaktion untereinander wichtig sind.

Am besten untersucht sind die DRFs (*Diaphanous related* Formine), zu denen Dia, DAAM und FMNL gehören. Sie werden durch Rho-GTPasen aktiviert. Der C-terminale Bereich der DRFs ist der eigentliche Aktin-Assemblierungs-Apparat, während der N-terminale Teil den regulatorischen Bereich darstellt. Im C-terminalen Bereich befinden sich

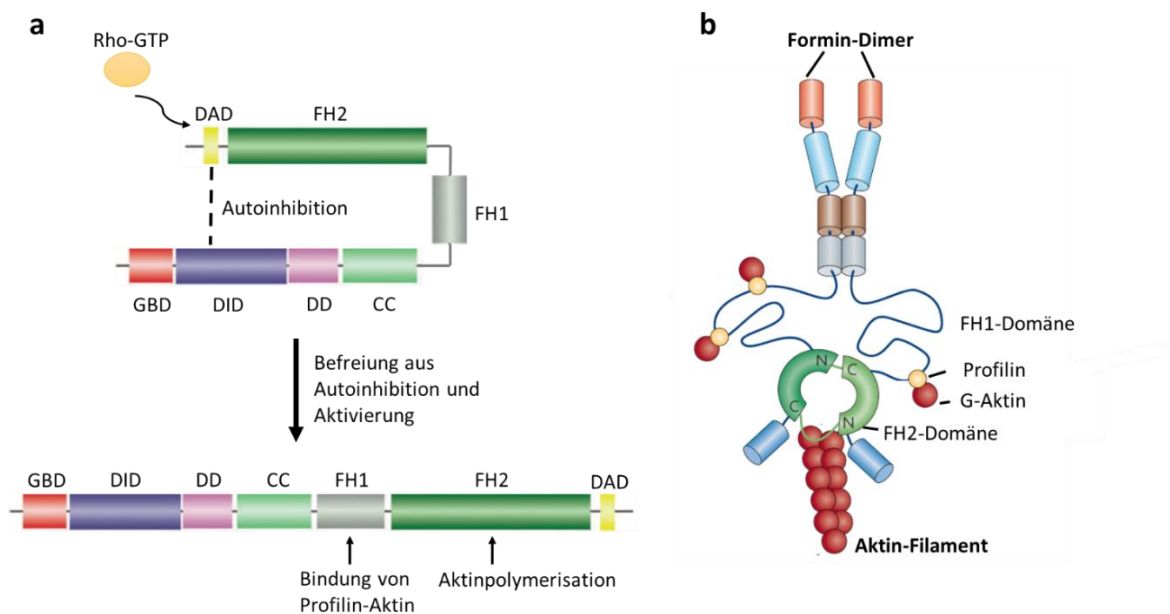
drei strukturelle Elemente: die Profilin-bindende FH1-Domäne, die Aktin-bindende FH2-Domäne und die *diaphanous*-autoregulatorische Domäne (DAD). Der N-terminale Bereich besteht aus vier strukturellen Elementen: der GTPase-bindenden Domäne (GBD), der *diaphanous*-inhibitorischen Domäne (DID), der Dimerisierungsdomäne (DD) sowie der *coiled-coil*-Region (CC) (Abb. 3 a). Die beiden Domänen DD und CC sind für die Homo-Dimerisierung des N-terminalen Bereichs aktivierter Formine von Bedeutung (Goode and Eck 2007).

Im Grundzustand liegen prototypische Formine in einem autoinhibierten Zustand vor, der durch intramolekulare Interaktion der DID und DAD bedingt ist. Für mDia1 konnte gezeigt werden, dass es auch durch eine Interaktion der DIDs und DADs innerhalb eines Homo-Dimers zu einer Autoinhibition kommen kann (Kovar 2006). Weiterhin konnten Copeland et. al zeigen, dass dies auch innerhalb von mDia1/mDia2-Hetero-Dimeren auftritt (Copeland et al. 2007). Diese Studie wies erstmals auf die Fähigkeit von Forminen hin, Hetero-Dimere ausbilden zu können. Auch den Forminen FMNL2 und FMNL3 konnte biochemisch durch Ko-Immunpräzipitationen der N- und C-terminalen Bereiche, sowie der ganzen Proteine die Ausbildung von Hetero-Dimeren nachgewiesen werden (Vaillant et al. 2008). Dennoch ist zu diesem Thema bisher wenig bekannt.

Durch Bindung einer aktiven GTPase an die GBD und vermutlich weitere Regulatoren (Li and Higgs 2005) erfolgt die Befreiung aus dem autoinhibierten Zustand. So konnte beispielsweise für das Formin FMNL2 gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der DAD durch die Kinase PKC $\alpha$  zur Befreiung aus der Autoinhibition beiträgt (Wang et al. 2015). Dabei kann ein Formin durch mehr als eine GTPase aktiviert werden, wie es für mDia2 gezeigt ist (Pellegrin and Mellor 2005; Ji, Jayapal, and Lodish 2008; Wallar et al. 2007). Die Aktin-Polymerisation der Aktinfilamente erfolgt durch die FH2-Domäne (Pruyne et al. 2002). Aktivierte Formine dimerisieren und bilden mit ihren FH2-Domänen eine sogenannte Donut-Form durch die monomeres ATP-Aktin in das Aktinfilament inkorporiert wird (Abb. 3 b). Einige Studien beschreiben, dass die FH2-Dimere dabei zwischen einer offenen und geschlossenen Konformation wechseln, um eine Inkorporierung neuer Monomere zu erlauben bzw. zu verhindern (Faix and Grosse 2006). Nach einem Modell von Xu et al. (Xu et al. 2004) erfolgt die Polymerisation treppenartig (*stair step*), indem eine Hälfte des Dimers am Filament gebunden ist und die andere Hälfte ein neues

Aktin-Monomer einbaut. Aufgrund ihres Verbleibens am Filament während dessen Aufbaus, blockieren sie das Ende für *Capping* Proteine und werden daher auch selbst als *leaky cappers* bezeichnet (Zigmond et al. 2003).

Die an die FH2-Domäne angrenzende FH1-Domäne leistet ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Polymerisation von Aktinfilamenten, indem sie die FH2-Domäne mit ATP-Aktin versorgt. Profilin-Aktin-Komplexe binden an die Prolin-reiche FH1-Domäne, was zu einer erhöhten Konzentration von ATP-Aktin am Plus-Ende des Aktinfilaments führt, welches dann durch die FH2-Domänen in das Aktinfilament inkorporiert werden kann (Witke 2004).



**Abb. 3: Domänenstruktur, Autoinhibition und Aktin-Polymerisation durch Formine**

(a) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DRFs. Die durch die DID (*diaphanous*-inhibitorische Domäne) und DAD (*diaphanous*-autoregulatorische Domäne) vermittelte Autoinhibition wird durch Bindung einer aktiven Rho-GTPase befreit und das Formin somit aktiviert. (modifiziert nach (Goode and Eck 2007)) (b) Die FH2-Domänen aktivierter Formine bilden ein Donut-förmiges Homodimer und inkorporieren monomeres G-Aktin in das Aktinfilament, während die Rekrutierung von Profilin-Aktin-Komplexen durch die FH1-Domänen erfolgt. (modifiziert nach (Chesarone, DuPage, and Goode 2010))

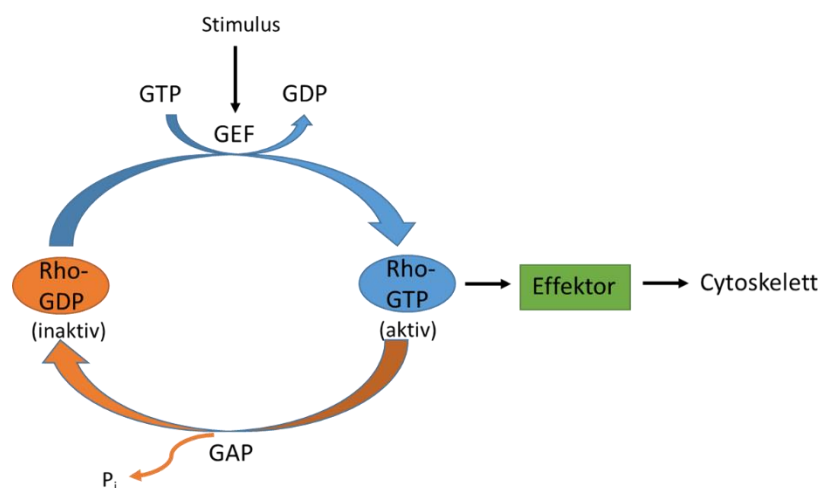
Die verschiedenen Formine unterscheiden sich sowohl in ihrer Domänenstruktur als auch in den Mechanismen der Aktin-Assemblierung. So wird beispielsweise das Formin DAAM nicht durch die klassische Interaktion von GTPasen mit der GBD aus dem auto-inhibierten Zustand befreit, sondern durch Interaktion des Phosphoproteins *Dishevelled* mit der DAD (Liu et al. 2008). Während Formine wie die FMNLs und mDia2 für den Aufbau und die Bündelung von Aktinfilamenten verantwortlich sind (Vaillant et al. 2008; Harris et al. 2006; Esue et al. 2008), beschleunigt INF2 neben der Polymerisation auch die Depolymerisation von Filamenten (Chhabra and Higgs 2007). Aufgrund ihrer spezifischen Einflüsse auf das Aktinzytoskelett sind Formine wichtig für den geordneten Ablauf verschiedener zellulärer Prozesse.

Dabei üben sie durch ihren direkten Einfluss auf die G-Aktin-Konzentration innerhalb der Zelle auch einen indirekten Einfluss auf den Kofaktor *megakaryocytic acute leukemia* (MAL) des Transkriptionsfaktors *serum response factors* (SRF) aus und damit auf die Expression Muskel- und Zytoskelett-spezifischer Gene.

Weiterhin gibt es erste Hinweise dahingehend, dass Formine neben ihrer primären Rolle bei der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts auch für den Ablauf des Zellzyklus von Bedeutung sein könnten. So reguliert das durch RhoA stimulierte Formin mDia1 in Endothelzellen den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus in Abhängigkeit von der Zellausbreitung (*spreading*) (Mammoto et al. 2004). RhoA selbst wird dabei durch Integrin-Signalwege, also durch die Zelladhäsion, aktiviert. Obwohl die Expression von konstitutiv aktivem mDia1 bei fehlender Zelladhäsion nicht den Übergang in die S-Phase bewirkte, konnte durch die Expression von dominant-negativem mDia1 der Übergang in die S-Phase verhindert werden. Dies konnte auch nicht durch eine zusätzliche Expression von konstitutiv aktivem RhoA gerettet werden. Auch wenn diesbezüglich bisher sehr wenig Untersuchungen durchgeführt wurden, deuten diese ersten Ergebnisse darauf hin, dass Formine an der Regulierung des Zellwachstums beteiligt sein können, indem sie eine Verbindung zwischen dem Zell-*spreading*, also der Adhäsion, und Zellzyklus schaffen.

### 1.1.2 Regulierung der Forminaktivität

Rho-GTPasen regulieren des Aktinzytoskelett über Interaktion mit der GBD von Forminen, wodurch sie Aktin-abhängige, zelluläre Prozesse wie beispielsweise Migration beeinflussen (Vega et al. 2011). Die Familie der Rho-GTPasen besteht aus 20 Mitgliedern, die wiederum in fünf Untergruppen eingeteilt werden: Rac, Cdc42, Rho, Rnd und RhoBTB. Sie wechseln zyklisch zwischen ihrer aktiven GTP-gebundenen und inaktiven GDP-gebundenen Form. Der Wechsel zwischen beiden Zuständen wird durch Rho *guanine nucleotide exchange* Faktoren (Rho-GEFs) und Rho-GTPase aktivierende Proteine (Rho-GAPs) kontrolliert. Dabei vermitteln Rho-GEFs den Austausch von GDP zu GTP, während Rho-GAPs die intrinsische GTPase-Aktivität von Rho-GTPasen stimulieren und somit den GDP-gebundenen Zustand der GTPasen fördern. Somit dienen Rho-GEFs der Aktivierung und Rho-GAPs der Inaktivierung von Rho-GTPasen (Abb. 4).



**Abb. 4: Zyklus der Rho-GTPasen**

Durch extrazelluläre Signale aktivierte Rho-GEFs (*guanine nucleotide exchange* Faktoren) ändern den inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand von Rho-GTPasen hin zum (GTP-gebundenen) aktiven Zustand. Aktivierte Rho-GTPasen binden an ihre Effektoren wie beispielsweise Formine, die verschiedene Funktionen haben. Rho-GAPs (GTPase *activating* Proteine) fördern die Inaktivierung von Rho-GTPasen, indem sie die Hydrolyse des GTPs zu GDP fördern.

Ein Formin kann durch unterschiedliche Rho-GTPasen aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass beispielsweise das Formin mDia2 durch Rif (Pellegrin and Mellor 2005), RhoB (Wallar et al. 2007) sowie Rac1 und 2 (Ji, Jayapal, and Lodish 2008) aktiviert wird.

Dabei steuert jede Rho-GTPase über das selbe Formin unterschiedliche zelluläre Prozesse: Während Rif die Ausbildung von Filopodien reguliert, steuert RhoB endosomale Prozesse über mDia2. Eine Rho-GTPase kann wiederum verschiedene Formine aktivieren. Die GTPase Cdc42 aktiviert die Formine mDia2, mDia3, FMNL1, FMNL2 und INF1, wodurch Cdc42 u.a. für die Lokalisierung von Mikrotubuli (Yasuda et al. 2004) und für die Aktinpolymerisation an der Spitze von Filopodien verantwortlich ist (Block et al. 2012).

### 1.1.3 Organisation Aktin-basierter Zellfortsätze

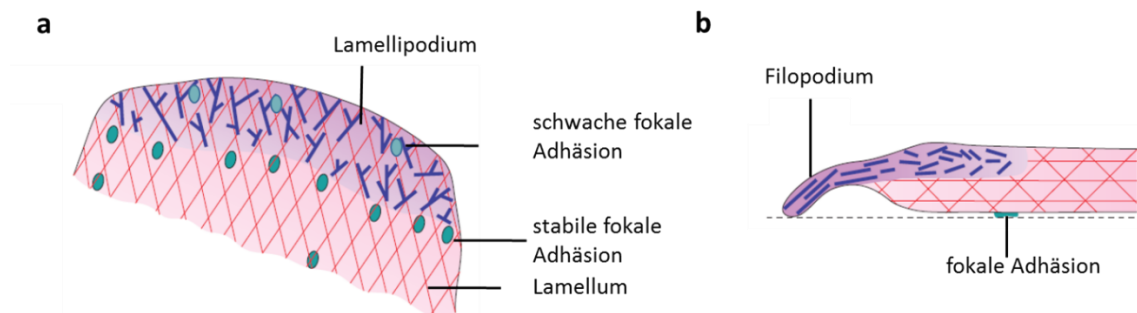
Sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch unter normalen physiologischen Bedingungen, ändern Zellen ihre Form, Position und Kontakte mit extrazellulären Strukturen. Eine wichtige Voraussetzung für diese äußerlichen Veränderungen der Zelle ist Motilität, welche die treibende Kraft für dynamische zelluläre Prozesse wie Zellmigration, Adhäsion und Kontraktion darstellt. Neben der physiologischen Relevanz von Migration und Motilität spielen diese auch eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen. Ermöglicht werden diese Prozesse unter anderem durch die dynamische Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. Für eine gerichtete Migration werden verschiedene dynamische Aktinstrukturen ausgebildet: Lamellipodien, Filopodien, *Ruffles*, fokale Adhäsionen und Stressfasern.

Lamellipodien sind flache, ausgedehnte Zellfortsätze der Zellfront (*leading edge*), die durch ein verzweigtes, dendritisches Aktinnetzwerk geformt werden. Dabei polymerisieren Aktinfilamente an der Zellfront und depolymerisieren am hinteren Teil des Fortsatzes (*treadmilling*), was zu einer Ausdehnung der Zellfront führt. Für die Ausbildung des dendritischen Aktinnetzwerks in Lamellipodien sind der Arp2/3-Komplex und dessen Co-Aktivator N-WASP hauptverantwortlich (Svitkina and Borisy 1999). An das Lamellipodium schließt sich das Lamellum als zelluläre Struktur an. Während die fokalen Adhäsionen (FAs) am Lamellipodium schwächer ausgeprägt sind, zeichnet sich das Lamellum durch stärkere Adhäsion an die extrazelluläre Matrix (EZM) aus (Abb. 5 a).

Im Gegensatz zu Lamellipodien sind Filopodien fingerförmige Ausstülpungen der Zellmembran an der Front von migrierenden Neuronen sowie anderen Zellen, die am Substrat oder benachbarten Zellen haften. Sie enthalten parallel angeordnete Aktinfilamente, deren Plus-Enden zur Membranvorderfront gerichtet sind. Formine wie mDia2 sind für die

dort stattfindende Aktinpolymerisation verantwortlich, die Verlängerung des Filopodiums vorangetrieben wird (Mattila and Lappalainen 2008) (Abb. 5 b). Aufgrund von Untersuchungen der Filopodien axonaler Wachstumskegel von Neuronen (Zheng, Wan, and Poo 1996) wird vermutet, dass Filopodien die richtungsgebenden Sensoren bei der Zellmigration darstellen.

Stressfasern bestehen aus Bündeln von 10-30 Aktinfilamenten, nicht muskulärem Myosin II und *cross-linking* Proteinen (S Pellegrin and Mellor 2007). Durch die Hydrolyse von ATP am Myosin kommt es zur Kontraktion der Aktin-Myosin-Bündel. Aufgrund ihrer zellulären Lokalisation werden Stressfasern in dorsale, ventrale und transversale Stressfasern unterteilt (Pellegrin and Mellor 2007), deren Aufbau durch Rho-GTPasen stimuliert wird (Giry et al. 1995). Ventrale Stressfasern befinden sich auf der Unterseite der Zelle und sind an beiden Enden mit fokalen Adhäsionen verbunden, während dorsale Stressfasern nur an einem Ende mit fokalen Adhäsionen verbunden sind. In Fibroblasten wurde gezeigt, dass ventrale Stressfasern parallel zur Migrationsrichtung angeordnet sind (Oliver, Lee, and Jacobson 1994). Da sie an beiden Enden mit FA verbunden sind, führen sie durch Kontraktion zur Retraktion des hinteren Zellendes und erfüllen damit eine wichtige Funktion bei der Migration von Zellen.



### **Abb. 5: Schematische Darstellung von Lamellipodien und Filopodien**

**(a)** Lamellipodien sind Membranausstülpungen an der Zellfront, die durch ein dendritisches Aktinnetzwerk geformt werden. Sie formen im Gegensatz zum Lamellum schwache Adhäsionen mit der EZM. **(b)** Filopodien sind fingerförmige, am Substrat anhaftende Membranausstülpungen am Lamellipodium migrierender Zellen. Sie enthalten parallel angeordnete Aktinfilamente, deren Plus-Ende zur Membran gerichtet ist. Dort stattfindende Aktinpolymerisation führt zum Wachstum des Filopodiums. (modifiziert nach (Chhabra and Higgs 2007))

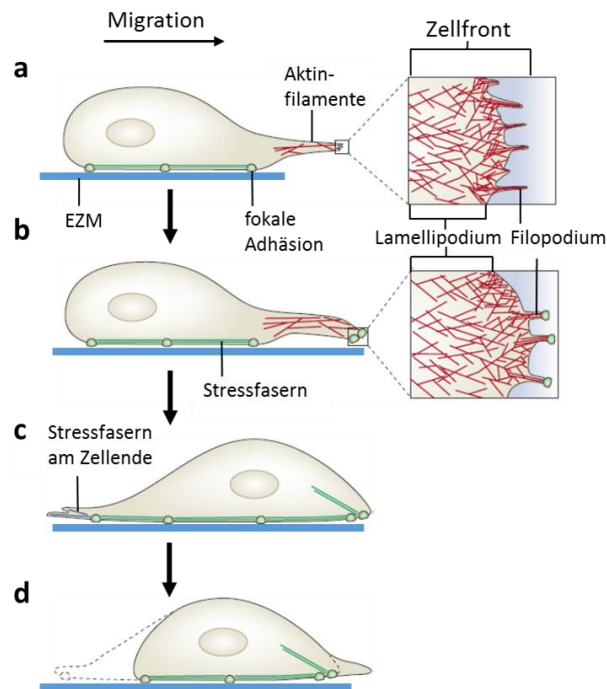
*Ruffles* sind kurzlebige, blattförmige Membranausstülpungen migrierender Zellen. Sie werden an der Zellfront von Lamellipodien ausgebildet, adhärieren jedoch nicht an der EZM. Wie in Lamellipodien wurden in Membran-*Ruffles* dendritische verzweigte Aktin-filamente beobachtet und der Arp2/3-Komplex scheint für die Ausbildung von *Ruffles* von Bedeutung zu sein (Chhabra and Higgs 2007).

### 1.2. Organisation des Aktinzytoskeletts bei der Zellmigration

Der dynamische Umbau des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts ist eine wichtige Grundlage für Zellmigration, welche in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Während der Entwicklung ist sie in Prozessen wie der Gastrulation notwendig, aber auch bei der Immunantwort ist Zellmigration unabdingbar. Neoplastische Erkrankungen sind durch außergewöhnlich starke Migration metastatischer Zellen gekennzeichnet (Hanahan and Weinberg 2011), weshalb die Untersuchung der Zellmigration wichtig für das Verständnis von Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen wichtig ist.

Die Migration von Zellen stellt einen stark abgestimmten vielstufigen Prozess dar, bei dem die Zelle eine charakteristische polarisierte Morphologie annimmt. Dabei findet Aktinpolymerisation an der Zellfront statt, während am Zellende eine Aktin- und Myosinvermittelte Retraktion stattfindet. An der Zellfront führt die Aktinpolymerisation zur Ausbildung komplexer Aktinstrukturen wie Lamellipodien und Filopodien. Das Lamellipodium dient der Ausbildung von Kontakten zwischen Zelle und EZM und bestimmt die Migrationsrichtung. Filopodien sind fingerartige Ausstülpungen am Lamellipodium, welche die Umgebung abtasten und dadurch zur Migration führen. Die am Lamellipodium geformten Fokalkontakte verbinden das Aktinzytoskelett mit der EZM, um die Zellvorderfront zu verankern. Durch fortlaufende Aktinpolymerisation an der Vorderfront wird die Zellmembran weiter erweitert und neue Adhäsionen geformt. Für die Vorwärtsbewegung sorgt eine Kontraktion von Aktomyosin-Filamenten am hinteren Zellende, was zum Loslösen der hinteren Adhäsionen und der Retraktion des hinteren Endes der Zelle führt (Abb. 6).



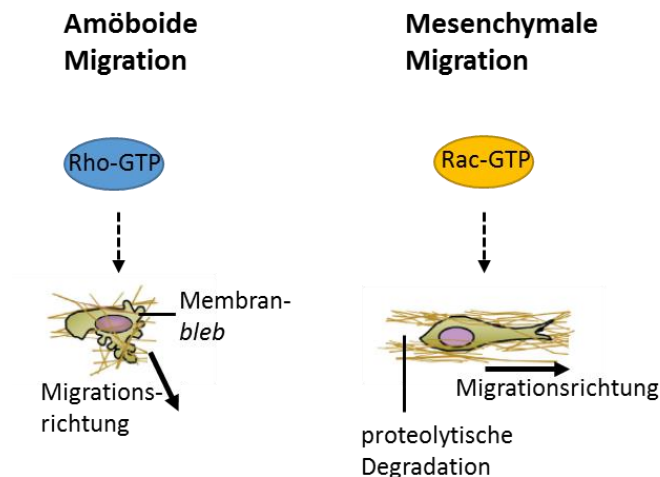


**Abb. 6: Zellmigration ist abhängig von verschiedenen Aktinfilamentstrukturen.**

(a) Durch Aktinpolymerisation kommt es zur Ausbildung von Membranausstülpungen an der Zellfront – bestehend aus Filopodien und Lamellipodien – an denen sich neue fokale Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix (EZM) ausbilden (b). Die Kontraktion von Aktomyosin-Filamenten am hinteren Zellende bewirkt dessen Retraktion und eine Bewegung der Zelle in Migrationsrichtung. Der wiederholte Ablauf dieser Phasen ermöglicht eine gerichtete Migration (c) und (d). (modifiziert nach (Mattila and Lappalainen 2008))

Bei der Migration von Einzelzellen in einer dreidimensionalen Matrix wird zwischen amöboider und mesenchymaler Migration unterschieden. Bei der amöboiden Migration handelt es sich um die Bewegung runder Zellen, die kaum fokale Adhäsionen und Stressfasern ausbilden und sich durch Lücken in der EZM drücken. Dabei kommt es oft zur Ausbildung von sogenannten *blebs* an der Membran (knospenartige Membranausstülpungen) und einer zunehmenden Rho-ROCK-Signaltransduktion (Fackler and Grosse 2008). Die mesenchymale Migration hingegen ist durch die Ausbildung von FAs sowie durch Degradation der EZM durch die migrierende Zelle gekennzeichnet. Die extrazelluläre Proteolyse erfolgt durch Sezernierung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die EZM-

Proteine wie Lamin, Kollagen und Fibronectin spalten. Weiterhin ist dieser Bewegungsmodus durch die Fibroblasten-artige Morphologie der Zellen und die Kontraktilität des Zytoskeletts charakterisiert (Friedl and Wolf 2009). In migrierenden Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass die mesenchymale Migration durch die Aktivierung der GTPase Rac gesteuert wird (Sanz-Moreno et al. 2008).



### Abb. 7: Migration von Zellen

Die Migration von Einzelzellen erfolgt entweder amöboid oder mesenchymal. Die durch Rho-GTPasen gesteuerte amöboide Migration ist durch fehlende Adhäsion mit der EZM, fehlende Degradation der EZM und mangelnde Stressfasern gekennzeichnet. Dabei bilden die migrierenden Zellen Membran-blebs aus und schieben sich durch Lücken in der EZM. Im Gegensatz dazu kommt es bei der mesenchymalen Migration, die durch Rac-Signaltransduktion induziert wird, zur Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten, MMP-vermittelten Proteolyse der EZM und zur Ausprägung von Stressfasern. (modifiziert nach (Friedl and Wolf 2009))

#### 1.2.1 Das Zytoskelett und Zell-Matrix-Adhäsionen

Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts spielt bei der Formgebung der Zelle eine ebenso große Rolle wie bei der Regulierung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten. Fokale Adhäsionen (FAs), an deren Aufbau etwa 50 verschiedene Proteine beteiligt sind, stellen wichtige Verankerungspunkte der Zellmembran an der zweidimensionalen extrazellulären Matrix (EZM) dar (Zamir and Geiger 2001). Sie bilden somit ein wesentliches Bindeglied zwischen der EZM und dem Aktinzytoskelett. FAs bestehen aus

einer Ansammlung von Integrin-Oberflächenrezeptoren, die nach Bindung ihrer extrazellulären Domäne an Proteine der EZM zur Rekrutierung weiterer Kinasen, GTPasen und Aktinfilament bindender Proteine, wie FAK (*focal adhesion kinase*) und  $\alpha$ -Actinin, führt. Die daraus resultierende Vielfalt an Signalkaskaden ermöglicht die Umwandlung extrazellulärer Stimuli in verschiedene intrazelluläre Signale, die neben Invasivität und Motilität, weitere wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation und Überleben regulieren (Provenzano and Keely 2011). Dies geschieht hauptsächlich durch den wichtigsten Regulierer der FA-Signalgebung – FAK, welche in Abhängigkeit von Integrin-Liganden-Bindung proliferative Prozesse unter anderem durch die MAPK-, Akt- und Ras-Signalwege reguliert (Wozniak et al. 2004; Provenzano and Keely 2011).

FAs, als Verankerungspunkte der Zelle an der EZM, stellen eine essentielle Struktur für die Zellmigration dar. Die Verknüpfung von Aktinstressfasern mit FAs, beides RhoA-abhängige Strukturen (Ridley and Hall 1992), ermöglicht der Zelle auf dem Substrat zu migrieren. Ebenso wichtig für die Migration von Zellen ist ein dynamischer Auf- und Abbau der fokalen Adhäsionen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Formine für diesen Prozess eine wichtige Rolle spielen. So ist bekannt, dass mDia1 und mDia2 die Umsatzrate fokaler Adhäsionen in migrierenden Zellen regulieren (Yamana et al. 2006; Gupton et al. 2007). Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass das Formin FMNL2 die Motilität von Zellen steigert, indem es die Internalisierung des FA-Oberflächenproteins Integrin  $\beta$ -1 fördert (Wang et al. 2015). Neben seinem Einfluss auf Zell-Matrix-Kontakte wurde FMNL2 ebenfalls als wichtiger Regulator von Zell-Zell-Kontakten (*adherens junctions*) in Epithelzellen identifiziert (Grikscheit et al. 2015).

### 1.2.2 Rolle der Formine FMNL1-3 in malignen Erkrankungen

Formine gehören zu den stärksten Aktinnukleatoren, wodurch sie zahlreiche physiologische Prozesse regulieren, aber auch eine Rolle in malignen Erkrankungen spielen. Verschiedene Studien weisen auf die Beteiligung von Forminen an der Motilität von Tumorzellen und dem Fortschreiten verschiedener Tumorerkrankungen hin. Aufgrund ihres Einflusses auf die Zellmotilität können Formine auch eine Bedeutung für die Metastasierung von Tumoren haben.

So konnte anhand von Patientenmaterial nachgewiesen werden, dass FMNL2 und FMNL3 im metastatischen kolorektalen Karzinom (CRC) verstärkt exprimiert sind (Zhu, Liang, and Ding 2008; Zeng et al. 2015).

Durch immunhistologische Untersuchungen von Patientenmaterial konnte eine Korrelation zwischen der FMNL2-Expression und der Metastasierung des CRC gezeigt werden. So wiesen primäre kolorektale Tumore mit lymphatischen Metastasen eine höhere FMNL2-Expression auf als Tumore ohne lymphatische Metastasen (Zhu, Liang, and Ding 2008). Weitere Studien zeigten, dass durch eine Runterregulierung der FMNL2-Expression das adhärenzte Wachstum, die Motilität und die Invasivität von CRC-Zelllinien vermindert wurde (Zhu et al. 2011). Durch Überexpression von FMNL2 wurde hingegen die Proliferation, Motilität und Invasivität kolorektaler Zelllinien erhöht. Diese Resultate wurden in Mausexperimenten bezüglich des Tumorwachstums bestätigt und zudem wurde eine FMNL2-abhängige, erhöhte Lebermetastasierungsrate festgestellt (Zhu et al. 2011).

In diesem Zusammenhang wurden des Weiteren im CRC zwei verschiedene mikroRNAs (miRs) identifiziert, die zur Degradation von FMNL2-mRNA und somit zu einer verminderten FMNL2-Expression führten. Durch ektopische Expression dieser miRs konnte das Wachstum subkutaner Tumore reduziert werden (Lu et al. 2015; Liang et al. 2013). Weiterhin konnten nach der Implantation miR-exprimierender Tumorzellen in den Blinddarm oder nach der Injektion miR-exprimierender Zellen in die Schwanzvene eine verminderte Darm- und Leber- (Liang et al. 2013) bzw. Lungenmetastasierung (Lu et al. 2015) detektiert werden.

Zudem wurde durch Untersuchungen von CRC-Gewebeproben und -Zelllinien ein Zusammenhang zwischen der FMNL2-Expression und der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) festgestellt. Demnach ist die durch FMNL2 verstärkte Invasivität auf eine Induktion der EMT zurückzuführen (Li et al. 2010), wodurch Zellen eine erhöhte Motilität erlangen. So konnte die durch den FMNL2-*Knockdown* reduzierte Invasivität von CRC-Zellen auch nicht durch das EMT-induzierende TGF- $\beta$  wiederhergestellt werden.

Weitere mechanistische Studien belegen, dass die FMNL2-abhängige Motilität und Invasivität von Tumorzellen durch die Rho-GTPasen Cdc42 und RhoC getrieben werden (Block et al. 2012; Kitzing et al. 2010). Als Effektor von Cdc42 begünstigt FMNL2 dabei die Motilität von Zellen durch Aktinpolymerisation an der Spitze von Lamellipodien

(Block et al. 2012). Dahingegen ist es als Effektor von RhoC bei der runden, amöboiden Migration der Zellen von Bedeutung (Kitzing et al. 2010).

Anhand immunhistologischer Färbungen von CRC-Geweben wurde nachgewiesen, dass neben FMNL2 auch FMNL3 im CRC signifikant höher exprimiert ist als in der umgebenden Mukosa (Zeng et al. 2015). Dabei korrelierte die Expression im primären CRC mit der Ausprägung von lymphatischen Metastasen sowie einer geringeren Überlebensrate der Patienten. Diese Ergebnisse wurden durch Mausexperimente bestätigt, in denen CRC-Zellen mit einem FMNL3-*Knockdown* ein schwächeres Wachstum subkutaner Tumore und eine reduzierte Lebermetastasierungsrate nach Injektion der Tumorzellen in den Blinddarm aufwiesen.

Die beiden Formine FMNL2 und FMNL3 weisen eine fast 70%-ige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen auf (Katoh and Katoh 2003). Diese Ähnlichkeit könnte erklären, dass beide Formine in der gleichen Tumorentität verstärkt exprimiert auftreten und ihre Runterregulierung ähnliche Effekte zeigte. Dabei wurde bei vergleichender Betrachtung der bisherigen Xenograft-Mausexperimente deutlich, dass durch die Runterregulierung von FMNL3 eine stärkere Wachstumsverminderung erzielt werden konnte als durch FMNL2-Expressionsverminderung (Liang et al. 2013; Lu et al. 2015; Zeng et al. 2015). Weiterhin könnten sich aus der Sequenzhomologie von FMNL2 und FMNL3 Redundanzen in ihrer zellulären Funktion ergeben.

Dahingegen wurde das vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimierte FMNL1 mit malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems in Zusammenhang gebracht. In Biopsien von T-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen wurde eine starke Überexpression von FMNL1 nachgewiesen (Favaro et al. 2006). Durch Untersuchungen von Patientenmaterial konnte ebenfalls eine Überexpression von FMNL1 bei 60 % der malignen Zellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) gezeigt werden (Schuster et al. 2007). Schuster et al. isolierten T-Zell-Klone, die spezifisch das FMNL1-Peptid erkannten. Diese zeigten wirksame Anti-Tumor-Effekte gegen Lymphom-Zelllinien sowie aus Patienten gewonnene Tumorproben mit CLL (Schuster et al. 2007). Weiterhin beeinträchtigte die Runterregulierung von FMNL1 in leukämischen Zelllinien das Tumorwachstum in Mausexperimenten sowie die Zellmigration (Favaro et al. 2013). Dabei zeigte sich nach Runterregulierung von FMNL1 eine verminderte adhärente Proliferation *in vitro*, ohne die Apoptoserate zu erhöhen. Dies wurde durch verminderte Ausbildung von Kolonien in

einer 3D-Methylcellulose-Matrix nach *Knockdown* von FMNL1 bestätigt (Favaro et al. 2013).

Aufgrund ihrer Funktion als Aktinnukleatoren und damit der verbundenen Bedeutung in invasiven Erkrankungen, stellen die Formine FMNL1-3 potentielle pharmakologische Ziele für die Inhibition der Tumormetastasierung dar.

### 1.3. Regulation des Transkriptionsfaktors SRF durch Aktin

Eine Folge des Formin-vermittelten Aufbaus von Aktinfilamenten ist die Aktivierung des *serum response* Faktors (SRF). Ursprünglich wurde SRF als nukleäres Protein isoliert, welches nach Serum-Stimulation zur Transkription zahlreicher Gene führt, darunter *immediate early* Gene, wie *c-Fos*, und Genen des Zytoskeletts, wie Aktin, Vinculin und Integrinen (Treisman and Klug 1986; Esnault et al. 2014). SRF ist als Transkriptionsfaktor in vielen Zelltypen exprimiert und ist für eine Vielzahl physiologischer und entwicklungsbiologischer Prozesse, wie Gastrulation, Funktionalität von Muskelzellen, neuronale Entwicklung und Leistungsfähigkeit des Immunsystems, von großer Bedeutung. SRF-Homodimere binden an die Kernsequenz des *serum response* Elements (SRE), namens CArG-Box. Diese besteht aus einer palindromischen CC(A/T)<sub>6</sub>GG-Sequenz (Treisman and Klug 1986). Die Koordinierung und Kontrolle der SRF-abhängigen Transkription erfolgt über die zwei Kofaktorfamilien *ternary complex* Faktoren (TCF) und *myocardin related* Transkriptionsfaktoren (MRFTs). Diese zwei unterschiedlichen Kofaktoren werden durch verschiedene Signalwege aktiviert und kontrollieren die Expression unterschiedlicher Zielgene. Der TCF-Signalweg wird durch die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalkaskade gesteuert, während der MRTF-abhängige Signalweg durch die Rho-GTPasen-abhängige Reorganisation des Aktinzytoskeletts reguliert wird.

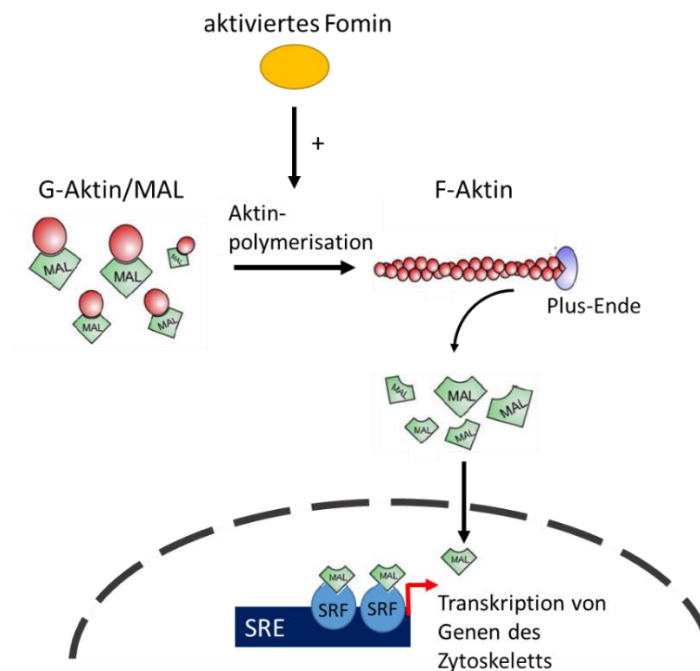
Die drei TCFs Elk-1, SAP-1 und Net bilden eine Untergruppe der *E twenty six* (Ets)-Domänen-Transkriptionsfaktoren. Über die MAPK-Signalkaskade werden TCFs im Nukleus aktiviert und bilden Komplexe mit SRF-Dimeren an dem an die CArG-Box angrenzenden TCF-Motiv (Buchwalter, Gross, and Wasylyk 2004) und regulieren die Expression von *immediate early* Genen.

Neben den TCFs stellen die MRTFs einen weiteren Kofaktor für die SRF-abhängige Transkription dar. Die meisten der insgesamt 960 SRF-abhängigen Zielgene werden

durch MRTFs kontrolliert (Esnault et al. 2014), darunter zahlreiche muskelspezifische Gene. MRTFs stellen aber auch SRF-unabhängige, direkte transkriptionelle Regulatoren dar, die die Expression anti-proliferativer Gene beeinflussen, welche beispielsweise den EGF-Rezeptor/MAPK-Signalweg beeinträchtigen (Descot et al. 2009). Zu der Familie der MRTFs gehören Myokardin, MRTF-A und MRTF-B. Diese Kofaktoren binden an SRF über eine positiv geladene Region und eine daran angrenzende Glutamin-reiche Region (Olson and Nordheim 2010). Des Weiteren befinden sich am N-terminalen Ende von MRTF-A und MRTF-B drei RPEL-Motive, die durch die Aminosäuresequenz Arg-Pro-X-X-X-Glu-Leu definiert sind. Diese RPEL-Domäne ermöglicht die Ausbildung stabiler Komplexe aus MRTF-A/B mit monomerem G-Aktin, während Myokardin aufgrund abweichender RPEL-Domänen eine schwächere Bindung von Aktin aufweist. Die subzelluläre Lokalisation von MRTF-A und -B wird durch die Konzentration an monomerem G-Aktin bestimmt. Durch freies, zytoplasmatisches G-Aktin werden MRTF-A und -B inaktiv im Zytoplasma gehalten. Wird jedoch die Aktinpolymerisation stimuliert, sinkt die G-Aktin-Konzentration, die SRF-Kofaktoren werden frei und translozieren in den Nukleus. Für MRTF-A wurde gezeigt, dass sich innerhalb der RPEL-Domäne eine *nuclear localization sequence* (NLS) befindet, die bei fehlender G-Aktin-Bindung die Translokation in den Nukleus ermöglicht (Pawlowski et al. 2010). Im Nukleus stimulieren die MRTFs schließlich die SRF-abhängige Transkription. Dabei konkurrieren TCFs und MRTFs im Nukleus um die Bindung an SRF, was eine Modulation der MRTF- und TCF-induzierten Genexpression ermöglicht (Wang et al. 2004).

Das prominente MRTF-A wurde im Zusammenhang mit der akuten juvenilen Megakaryoblasten-Leukämie (AMKL) beschrieben (Mercher et al. 2001) und wird daher auch als *megakaryocytic acute leucemia* (MAL) bezeichnet. Ein weiterer Name für MRTF-A ist ebenfalls *myocardin like protein* (MKL1). MAL bewegt sich zwischen Zytoplasma und Nukleus. Unter Ruhebedingungen wird es in einem Komplex mit G-Aktin im Zytoplasma gehalten und akkumuliert nach Serumstimulation im Nukleus (Miralles et al. 2003). Durch diesen Serumstimulus werden Rho-GTPasen aktiviert, die die Formin-vermittelte Aktinpolymerisation induzieren. Als Folge des Aufbaus von Aktinfilamenten wird die G-Aktin-Konzentration reduziert und MAL akkumuliert im Nukleus, wo es an SRF bindet und die Expression von Genen aktiviert (Miralles et al. 2003) (Abb. 5).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es auch im Nukleus zu einer Serum- und Integrin-abhängigen Aktinpolymerisation durch Formine kommt. Dies führt ebenfalls zur Akkumulation von MAL im Nukleus und entsprechender Transkription von MAL-SRF-Zielgenen (Baarlink, Wang, and Grosse 2013; Plessner and Grosse 2015).



**Abb. 8: Aktin-vermittelte Regulierung der MAL-SRF-abhängigen Transkription**

Monomeres G-Aktin wird von MAL gebunden, wodurch MAL im Zytoplasma gehalten wird. Durch Aktivierung von Forminen werden Aktinfilamente (F-Aktin) polymerisiert und die Konzentration an monomeren Aktin im Zytoplasma verringert. Das dadurch frei werdende MAL transloziert in den Nukleus, akkumuliert dort und stimuliert die SRF-abhängige Transkription von Zielgenen, die für das Zytoskelett von Bedeutung sind. (modifiziert nach (Faix and Grosse 2006))

Neben dem Einfluss von MAL-SRF auf die Transkription von Genen des Zytoskeletts konnte nachgewiesen werden, dass MRTF-A und -B Einfluss auf den Zellzyklus und die Proliferation von Zellen haben. So verlangsamte ein Knockdown der MRTFs die Proliferation und beeinflusste den Verlauf des Zellzyklus in Fibroblasten. Dabei traten eine Verkürzung der G<sub>1</sub>-Phase sowie eine Verlängerung der S- und G<sub>2</sub>-Phase auf (Shaposhnikov et al. 2013).



Weiterhin wurde SRF in embryonalen Stammzellen (ES) der Maus als ein entscheidender Faktor für den Aufbau fokaler Adhäsionen identifiziert (Schratt et al. 2002). Dabei beeinträchtigte der Knockdown von SRF in ES die Ausbreitung der Zellen (*spreading*), ihre Substratanheftung, sowie die Migration. Dies suggeriert eine Beteiligung von SRF an migratorischen Prozessen von Zellen.

Folgend konnte in Melanomzellen und Brustkarzinomzellen bestätigt werden, dass MRTF-A/B und SRF für die Adhäsion, die Zellausbreitung, Invasivität und Motilität *in vitro* von Bedeutung sind (Medjkane et al. 2009). In Mausexperimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein Knockdown von MRFT oder SRF zu einer verminderten Besiedelung der Lunge durch Tumorzellen aus dem Blutstrom führte. Dahingegen wurde weder die adhärente Proliferation von Melanomzellen durch eine MRTF-A/B- oder SRF-Runterregulierung noch das Wachstum entsprechender Tumor-Xenografts durch MRTF-A/B-Runterregulierung beeinflusst.

Mit Hilfe von transgenen Mäusen konnte hingegen nachgewiesen werden, dass konstitutiv aktives SRF zur Entstehung von stark proliferierenden Leberknötchen führte, die sich zum tödlichen hepatozellulären Karzinom entwickelten (Ohrnberger et al. 2015).

### 1.4 Melanom

Hautkrebs gehört zu den am häufigsten vorkommenden Krebsarten, mit steigender Tendenz. Es wird dabei zwischen den häufiger vorkommenden nicht-Melanom-Hautkrebsformen und dem selteneren Melanom unterschieden. Jährlich werden zwei bis drei Millionen Neuerkrankungen an nicht-Melanom-Hautkrebs und 135 000 Neuerkrankungen an Melanom allein in den USA registriert (Skin Cancer Foundation). Obwohl Melanom die seltenere Form des Hautkrebs ist, weist es die deutlich höhere Mortalitätsrate auf (WHO). Wird es frühzeitig erkannt, haben Patienten gute Heilungschancen. Geschieht dies allerdings nicht, versterben die meisten Patienten aufgrund der stark ausgeprägten Metastasierung des Melanoms. Die genaue Entstehungsursache des malignen Melanoms ist unklar, aber starke UV-Belastung der Haut erhöht das Erkrankungsrisiko.

Melanome entwickeln sich aus Melanocyten, den Pigmentzellen der Haut, und zählen aufgrund ihrer Herkunft zu Tumoren neuroektodermalen Ursprungs. Neben der Haut kann das maligne Melanom, wenn auch seltener, Augen, Schleimhäute sowie den Darm betreffen.

Etwa 70% der malignen Melanome weisen eine Mutation verschiedener Onkogene wie B-Raf, MEK1 oder N-Ras auf. Davon tragen wiederum etwa 50% eine Mutation des Proto-Onkogens B-Raf, häufig in Zusammenhang mit inaktivierenden Mutationen des Tumorsuppressors p53 (Rahman et al. 2013; Chen et al. 2012). Das mutierte, konstitutiv aktive B-Raf V600E führt zu einer Überaktivierung des MAPK-Signalwegs und generiert spontan Proliferations- und Überlebenssignale. Somit ist es Melanomzellen, die diese B-Raf Mutation tragen möglich, unabhängig von Integrin-vermittelter Zelladhäsion zu proliferieren (Conner, Scott, and Aplin 2003). Neben der Adhäsions-unabhängigen Proliferation fördert mutiertes B-Raf auch die Invasivität von Melanomzellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Rho-GTPase Rnd3, ein Effektor des mutierten B-Raf, die Motilität von Melanomzellen in dreidimensionaler Matrix fördert (Klein and Aplin 2009).

In anderen Studien konnte eine fehlregulierte Integrinexpression auf der Oberfläche von primären und metastatischen Zellen des malignen Melanoms festgestellt werden (Kuphal, Bauer, and Bosserhoff 2005), wodurch die Zellen unterschiedliche Substrate erkennen können, was ihnen die Fähigkeit verleiht, zu metastasieren.

Bisher beinhaltete die Behandlung des Melanoms im fortgeschrittenen Stadium neben der chirurgischen Entfernung des Primärtumors und einer Strahlen- und Chemotherapie auch die Behandlung mit pharmakologischen BRAF- oder MEK-Inhibitoren, die lediglich eine zeitlich begrenzte Wirksamkeit aufwiesen. Die Ansprechraten lagen bei 5-15 % und erhöhten die Gesamtüberlebensrate um sechs bis neun Monate. Seit kurzem stehen jedoch neue, auf Immuntherapien basierende Substanzen zur Verfügung, mit denen längerfristige Effekte erzielt werden: Durch Blockade der Immun-*Checkpoints* PD-1 (*programmed cell death 1*) und CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) wird eine T-Zell-basierte Immunantwort gegen Krebs ausgelöst (Ribas 2015). Der CTLA-4-Antikörper *Ipilimumab* ist seit 2011 zugelassen und wird bereits erfolgreich klinisch eingesetzt. Nach vielversprechenden Ergebnissen in klinischen Studien wurde der PD-1-Antikörper *Nivolumab* ebenfalls 2015 zugelassen.

Aufgrund der aggressiven, stark metastatischen Eigenschaften des Melanoms, eignet es sich besonders gut zur Analyse von Invasivität und zur Identifizierung neuer pharmakologischer Ziele für dessen Bekämpfung. Im CRC konnte bereits eine Korrelation zwischen einer erhöhten FMNL2- und FMNL3-Expression und gesteigerter Invasivität und Metastasierung festgestellt werden. Der Onlineplattform Oncomine zufolge, sind diese

beiden Formine ebenfalls im metastatischen Melanom verstärkt exprimiert, wodurch diese Tumorentität für weiterführende Untersuchungen der Formine FMNL1-3 sehr gut geeignet ist.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisher wurde die Rolle der Formine in erster Linie in Bezug auf die Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen analysiert. Obwohl die FMNLs bereits mit Tumorerkrankungen wie CRC und Leukämien in Verbindung gebracht wurden, ist bisher weniger über ihre Bedeutung für die Proliferation von Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* bekannt. Obwohl gezeigt wurde, dass eine Runterregulierung der FMNLs in entsprechenden Tumorentitäten zu vermindertem Tumorwachstum führte, sind die zugrunde liegenden Mechanismen kaum untersucht. Weiterhin gibt es zwar erste Hinweise auf eine Verbindung zwischen Forminen und dem Zellzyklus, ihre genaue Beteiligung daran ist bisher jedoch weitestgehend ungeklärt.

Nach einer Analyse der Expression von FMNL1-3 in verschiedenen Melanomzelllinien sollte an einer Auswahl von Zelllinien Folgendes untersucht werden:

1. Welchen Einfluss haben FMNL1-3 auf das adhärente Wachstum?
2. Beeinflussen FMNL1-3 das nicht-adhärente Wachstum in 3D-Matrices?
3. Welche Rolle spielen die drei FMNLs bei dem Zellzyklus und der Apoptose?
4. Inwiefern beeinflusst eine Runterregulierung von FMNL1-3 die Invasivität von Zellen *in vitro*?
5. Haben diese Formine einen Einfluss für die Metastasierung im Mausmodell?
6. Kann ihre transiente Runterregulierung in einer *in vivo* Therapiestudie das Tumorwachstum beeinträchtigen?

Für diese Analysen wurde die FMNL-Expression in Melanomzelllinien durch shRNAs und siRNAs runterreguliert. Da besonders FMNL2 und FMNL3 untereinander starke Sequenzhomologien aufweisen, sollte zudem bei allen Untersuchungen mit Hilfe von siRNA-vermittelten Doppelknockdowns geprüft werden, inwiefern die drei FMNLs untereinander funktionelle Gruppen bildeten und sich Synergismen zeigten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 1: Reagenzien und Enzyme

Reagenz	Hersteller
Acrylamid (30%)-Bisacrylamid (0.8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Alexa Fluor 647 Phalloidin	Invitrogen, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
BES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Caspase Glo 3/7	Promega, Mannheim
Collagen, vom Rind, aufgereinigt	Advanced Biomatrix, Carlsbad
DAB, Peroxidase Substrat	Vector Laboratories, Burlingame
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) <i>high glucose</i>	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Promega, Madison
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (1, 4-dithithreitol)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Fibronectin, aus Rinderplasma	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FLAG-konjugierte Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluoreszenz mounting Medium	DAKO, Glostrup
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
FUGENE HD	Promega, Madison
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
G418 Sulfat	PAA/GE Healthcare, Cölbe
iQ SYBR-Green Supermix	Bio-Rad, München
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine LTX	Life Technologies, Darmstadt

Lipofectamine RNAiMAX	Life Technologies, Darmstadt
Matrigel (Growth Factor Reduced)	BD Biosciences, Heidelberg
MEM Pulver	PAA/GE Healthcare, Cölbe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Nocodazol	Cell Signaling, Cambridge
NP-40 Alternative	Merck, Darmstadt
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
PBS (phosphate buffered saline)	Capricorn, Ebsdorfergrund
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein - Größenstandard (PageRuler)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Puromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Random Hexamer	Invitrogen, Karlsruhe
RevertAid M-MuLV reverse Transkriptase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Rhodamin - Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
RiboLock Ribonuclease Inhibitor	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RNase freies Wasser	Promega, Madison
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N, N', N'-tetramethyl-ethan-1, 2-diamin)	Roth, Karlsruhe
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Trockenmilchpulver (fettfrei)	AppliChem, Darmstadt
Trypsin-EDTA 0.05%	Capricorn, Ebsdorfergrund
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Vectastain ABC System	Vector Laboratories, Burlingame
Zellproliferations-Reagenzie WST1	Roche, Basel

Tabelle 2: Standardlösungen und -puffer

Lösung	Zusammensetzung	
BES-gepufferte Saline (BBS) 2x	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
	pH 6.95	
Citratpuffer A	Zitronensäure	0,1 M
Citratpuffer B	Natriumcitrat	0,1 M
Firefly Assay Puffer 3X	DTT	15 mM
	Coenzym A	0,06 mM
	ATP	0,45 mM
	Luciferin	4,2 mg/ml
	in Triton Lysepuffer ohne Triton	
Fraktionierungspuffer P1	HEPES	10 mM
	KCl	10 mM
	EGTA	0.1 mM
	DTT	1 mM
	Proteaseinhibitorcock- tail	1x
Fraktionierungspuffer P2	HEPES	20 mM
	NaCl	400 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Proteaseinhibitorcock- tail	1x
IP-Puffer	Tris	20 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mM
	Triton X-100	1 %
	Glycin	5 %

Lämmli-Puffer 4X	Tris	286 mM
	EDTA	10 mM
	Glycerol	28 %
	SDS	5,7 %
	Bromphenolblau	3.5 mg/ml
	$\beta$ -Mercaptoethanol	4.7 mg/ml
PBST	PBS	1x
	Triton X-100	0,3 %
Propidiumiodid-Färbelösung	Propidiumiodid	50 $\mu$ g/ml
	RNase A	0,1 mg/ml
	Triton X-100	0,05 %
	in PBS	
Renilla Assay Puffer 3X	PTC124 in DMSO	0.06 mM
	h-CTZ in Ethanol	0.01mM
	in Renilla Salze-Lösung	
Renilla-Salze-Lösung	Na <sub>2</sub> EDTA	45 mM
	Na Pyrophosphat	30 mM
	NaCl <sub>2</sub>	1,452 M
	in H <sub>2</sub> O	
SDS-PAGE Laufpuffer	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
	pH 8.3	
SDS-PAGE Sammelgel	RotiPhorese Gel 30	19 %
	TEMED	14,5 $\mu$ M
	SDS	0,1 %
	Tris-HCl	0,12 M
	APS	0,15 %
	pH 6.8	
SDS-PAGE Trenngel	RotiPhorese Gel 30	X %
	TEMED	9.5 $\mu$ M
	SDS	0,1 %
	Tris-HCl	0,36 M
	APS	0,1 %
	pH 8.8	

TBST-Puffer	NaCl	500 mM
	Tris-HCl	20 mM
	Tween-20	1 %
	pH 7.5	
Triton Lysepuffer	Tris-HCl	0,1082 M
	Tris-Basispuder	0,0419 M
	NaCl	75 M
	MgCl	3 mM
	Triton X-100	0,25 %
	in H <sub>2</sub> O ad 100 ml	
Western Blot-Transferpuffer 1X	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	10 %
	SDS	0,2 %

Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor 488, anti-Maus	Life Technologies, Carlsbad
anti-CDK4, Kaninchen, monoklonal	Cell Singaling, Cambridge
anti-Cyclin D1 (C20), Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Dallas
anti-Phospho-FAK (Tyr397), Kaninchen monoklonal	Cell Signaling, Cambridge
anti-FLAG, Maus monoklonal, HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Phospho-FAK (Tyr 397), Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Cambridge
anti-FMNL1, Kaninchen polyklonal	zur Verfügung gestellt von D. Billadeau, Mayo Clinic, Rochester
anti-FMNL2, Kaninchen polyklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-FMNL3, Kaninchen polyklonal	zur Verfügung gestellt von D. Billadeau, Mayo Clinic, Rochester
anti-HDAC2, Kaninchen, monoklonal	Abcam, Cambridge
anti-ITGB1, Maus, monoklonal	Beckman Coulter Inc., Pasadena
anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP-konjugiert	BioRad, Hercules
anti-Maus IgG (H+L) HRP-konjugiert	Amersham, Amersham
anti-MRTF-A (C19), Ziege, polyklonal	Santa Cruz, Dallas
anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling, Cambridge
anti-Vinculin, Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Tubulin, Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling, Cambridge



anti-Ziege IgG (H+L) HRP-konjugiert	Jackson ImmunoResearch, West Grove
-------------------------------------	---------------------------------------

Tabelle 4: qPCR-Primer

Name	Sequenz 5' nach 3
Cofilin1 fwd	CAAGGAGAGCAAGAAGGAGGAT
Cofilin 1 rev	GTCCTTGGAGCTGGCATAAAT
Egr1 fwd	ACCTGACCGCAGAGTCTTTTC
Egr1 rev	GCCAGTATAGGTGATGGGGG
FMNL1 fwd	CTGCTGAGCCAGTATGACAAC
FMNL1 rev	CCCCACCAGTATCCACATAGC
FMNL2 fwd	ATCTCTCATTTGCACAGTACGC
FMNL2 rev	GATGGACCTACTCCAGGGCTT
FMNL3 fwd	ATCAGTACGGATTCAACCTGGT
FMNL3 rev	GCCAGAAGCTCTAAGACAAGGG
GAPDH fwd	CCCTTCATTGACCTCAACTA
GAPDH rev	CCTAAGTTGTCATGGATGAC

Tabelle 5: siRNA-Sequenzen für FMNLs (FlexiTube siRNA, Qiagen)

siRNA Name	Gen	Zielsequenz
Hs_FMNL1_6	FMNL1	CAAGCAGACGCTGCTGCACTA
Hs_FMNL1_7	FMNL1	TCCGCTGTGGCCCGCCTCAAA
Hs_FMNL1_8	FMNL1	CAGCACCCAAGTCACCGCCAA
Hs_FMNL1_9	FMNL1	ACGCGCCATCATGAACTACCA
Hs_FMNL2_7	FMNL2	ATGAACCTACCTCCTGACAAA
Hs_FMNL2_6	FMNL2	CAAATTAGGCCTGGACGAATA
Hs_FMNL3_1	FMNL3	CAGGAGTAATCTGACTCTAAA
Hs_FMNL3_5	FMNL3	AACTAGCAAGCAGTTAAGCTA
Hs_FMNL3_6	FMNL3	CACTTGCGACAGTATCAAGAA
Hs_FMNL3_7	FMNL3	CACCCTGCGGAGGCTCATTA
/	MRTF-A/B	ATGGAGCTGGTGGAGAAGAA
Hs_SRF_5	SRF	CAAGATGGAGTTCATCGACAA

Tabelle 6: shRNA-Sequenzen (Thermo Scientific)

Lentivirale shRNA im Vektor pGIPZ	Gen
V2LHS_213830	FMNL1
V3LHS_309274	FMNL1
V3LHS_384848	FMNL2
V3LHS_384851	FMNL2

V3LHS_329892	FMNL3
V3LHS_329890	FMNL3

Tabelle 7: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Spezies</b>	<b>Medium</b>	<b>Ursprung</b>
FEMX	H. sapiens	DMEM	Melanomzellen
HEK 293T	H. sapiens	DMEM	embryonale Nierenzellen
LOX	H. sapiens	DMEM	Melanomzellen
Mel6	H. sapiens	DMEM	Melanomzellen
MeWo	H. sapiens	DMEM	Melanomzellen
MV3	H. sapiens	DMEM	Melanomzellen
WM278	H. sapiens	Tumormedium	Melanomzellen
1205-Lu	H. sapiens	Tumormedium	Melanomzellen

Tabelle 8: Geräte und Materialien

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Anthos HT2 Plattenleser	Anthos, Krefeld
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biofuge stratos	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Costar ultra-low attachment surface - Platten	Corning, New York
Eclipse Ti	Nikon, Tokio
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Allmendingen
Inkubator	Forma Scientific
LSM700	Zeiss, Jena
Medizinische Röntgenfilme (blau)	Kodak, Rochester
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
NanoDrop 1000 (Spectrophotometer)	peQLab
pH-Meter70	Mettler Toledo
Protran Nitrocellulose Transfermembran 0.45 µm	Whatman
Real-Time Quantitative Thermal Cycler (PCR) 96-Well	BioRad, Hercules
Mini-Trans-Blot System	BioRad, Hercules
Sonoplus GM Homogenisierer	Bandelin
ThinCert Zellkultureinsätze	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Vortex Genie 2	Scientific industries
X-Ray Film Processor	Medical Index GmbH
µ-Slides, 6-channel	Ibidi, Martinsried

### 2.1.1 Expressionsvektoren

Für Reporteranalysen wurden das Kontrollplasmid pRL-TK (Promega) und der Expressionsvektor pGL3D.AFOS (Treisman, London, England) (Hill, Wynne, and Treisman 1995) verwendet. Der pGL3D.AFOS Vektor trägt den cFos-Promotor und als Reporter drei Kopien des *Serum Response Elements* (SRE), wodurch er der SRF-abhängigen Expression der Firefly-Luciferase dient. Zur Normierung der Firefly-Luciferase-Aktivitäten diente das kotransfizierte interne Kontrollplasmid pRL-TK, welches unter Kontrolle des viralen Thymidin-Kinase Promotors Renilla-Luciferase exprimiert. Als Positivkontrolle wurde für die Reporteranalysen das Konstrukt pEF.mDia1F1F2+C (Copeland et al. 2007) verwendet, welches zur Expression von konstitutiv aktivem mDia1 führt.

Die Generierung stabiler Zelllinien erfolgte unter Verwendung der lentiviralen Expressionsvektoren pInducer20 (Meerbrey et al., 2011) und der shRNA-exprimierenden pGIPZ-Vektoren (Thermo Scientific) sowie den lentiviralen Verpackungsplasmiden psPAX und pMDG.2 (J. Swiercz, MPI, Bad Nauheim). Der pGIPZ-Vektor führt zu einer stabilen Expression von GFP und einer gewünschten shRNA unter Kontrolle des Cytomegalovirus-(CMV-)Promotors. Der Vektor pInducer20 MAL $\Delta$ N-GFP wurde von Christian Baarlink (BPC, Marburg) bereitgestellt. Dabei wurde das MAL $\Delta$ N-Konstrukt (Miralles et al. 2003), welches aufgrund der fehlenden RPEL-Motive kein G-Aktin binden kann und daher konstitutiv aktiv ist, C-terminal mit GFP markiert.

Für die Überexpression von FMNL2 und FMNL3 für die Ko-Immunpräzipitation wurden die Plasmide pEF.FLAG.FMNL3 (J. Copeland, Universität von Ottawa, Kanada) und pEF.HA.FMNL2 verwendet. Der Vektor pEF.HA.FMNL2 wurde von Ying Wang (BPC, Marburg) bereitgestellt.

## 2.2. Biochemische Methoden

### 2.2.1 Ko-Immunpräzipitation

MV3 Zellen wurden am Vortag in 15 cm Kulturschalen mit den entsprechenden Konstrukten mittels FuGENE transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in IP-Lysepuffer (mit Proteaseinhibitoren) aufgenommen. Die Zelllysate wurden nach Sonifizierung und 30-minütiger Zentrifugation bei 16 000 x g (4 °C) mit anti-FLAG-Agarose-Beads für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit IP-Lysepuffer wurden die Proben in 2X Lämmli-puffer zum weiteren Nachweis präzipitierter Proteine mit Hilfe von Western Blot aufgenommen.

### 2.2.2 Nukleäre und zytoplasmatische Fraktionierung

Die Zellen wurden geerntet und bei 800 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Fraktionierungspuffer P1 resuspendiert und für 15-20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Sedimentierung der Nuklei erfolgte nach kurzem Vortexen der Proben bei 10 000 g für 10 Minuten. Für spätere Analysen wurde der Überstand, welcher die zytoplasmatische Fraktion enthält, bei -80 °C aufbewahrt. Die pelletierten Nuklei wurden drei Mal mit Puffer P1 gewaschen, anschließend im Puffer P2 aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der nukleäre Extrakt wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 12 000 x g gewonnen. Die Reinheit der gewonnenen Extrakte wurde durch Immunoblotting für nur im Zytoplasma vorhandenes  $\alpha$ -Tubulin und nur im Zellkern vorkommendes HDAC2 kontrolliert.

### 2.2.3 SDS-PAGE und Western Blot

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Zugabe von SDS-haltigem Lämmli-puffer zu den jeweiligen Proben (IP-Proben oder Zelllysate) wurden die Proteine denaturiert. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und durch Zentrifugation bei 12 000 x g für 10 Minuten gereinigt.

Zur Auftrennung der Proteine dienten zwischen Glasplatten gegossene Polyacrylamid-gel (Trenngel), die nach ihrer Polymerisierung mit Sammelgelen überschichtet wurden.

Die aufbereiteten Proben wurden zusammen mit dem vorgefärbten Protein-Größenstandard auf die in der Laufkammer (Biorad) montierten Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V.

Die im SDS-PAGE aufgenommenen Proteine wurden im Anschluss auf eine Nitrozellulose-Membran (Whatman) transferiert. Dies erfolgte im Mini-Trans-Blot-Systems (Biorad) bei konstant 350 mA für 1 bis 2 Stunden bei 4 °C. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit Ponceau S gefärbt, um den Grad des Transfers zu kontrollieren und anschließend für mindestens 1 Stunde in TBST mit 5 % Magermilchpulver bei Raumtemperatur blockiert. Die Immundetektion der Proteine erfolgte durch die Inkubation der Membran mit in Blockierpuffer verdünntem Primärantikörper (siehe Tabelle 9) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran drei Mal mit TBST gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden in Blockierpuffer verdünnten *horseradish peroxidase* (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 9) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die durch Antikörper markierten Proteinbanden mit Hilfe des ECL-Substrats (*Enhanced Chemiluminescence*) auf Röntgenfilmen nachgewiesen.

Tabelle 9 Antikörperlösungen und Blockierpuffer für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Blockierpuffer
anti-CDK4	1:1000	Milch in TBST
anti-cyclin D1	1:200	Milch in TBST
anti-Phospho-FAK (Tyr397)	1:1000	BSA in TBST
anti-FLAG	1:2000	Milch in TBST
anti-FMNL1	1:2000	Milch in TBST
anti-FMNL2	1:2000	Milch in TBST
anti-FMNL3	1:2000	Milch in TBST
anti-HDAC2	1:2000	Milch in TBST
anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP-konjugiert	1:5000	Milch in TBST
anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	1:1000	BSA in TBST
anti-Maus IgG (H+L) HRP-konjugiert	1:5000	Milch in TBST
anti-MRTF-A (C19)	1:200	Milch in TBST
anti-Phospho-p44/42 MAPK	1:1000	Milch in TBST
anti-Vinculin	1:200	Milch in TBST
anti-Tubulin	1:2000	Milch in TBST
anti-Ziege IgG (H+L) HRP-konjugiert	1:5000	Milch in TBST

### 2.3. Molekularbiologische Methoden

Die Analyse der si- und shRNA-vermittelten Expressionsverminderung sowie die Expressionsanalyse verschiedener MAL-SRF-Zielgene basierte auf der Extraktion zellulärer RNA, folgender cDNA-Synthese und deren Quantifizierung mittels *real time* PCR.

#### 2.3.1 RNA-Isolation mit Trizol

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und direkt in der 6-well Kulturschale durch Zugabe von 1ml Trizol lysiert. Das Zelllysate wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt, nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform kurz gevortext und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung wurde anschließend durch Zentrifugation bei 12 000 x g für 15 Minuten bei 4 °C erreicht. Die obere, RNA-haltige Phase, wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gemischt, um die RNA zu präzipitieren. Nach einer Zentrifugation bei 12 000 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurde das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

#### 2.3.2 Reverse Transkription der gesamt-RNA

Die RNA wurde wie in 3.3.1 aus den Zellen extrahiert. 1 µg der RNA wurde mit 1 µl des 100 µM Random Hexamer Primer für 7 Minuten bei 65 °C inkubiert. Daraufhin folgte eine PCR mit folgendem Mix: 1 µl Reverse Transkriptase, 1X Reverse Transkriptase Puffer, 2 µl des 10 mM dNTP-Mixes, 1 µl RNase Inhibitor, was auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt wurde. Dieser Ansatz wurde zu dem RNA/Primer-Mix gegeben und gut durchmischt. Die Reaktion zur cDNA-Synthese fand unter folgenden Bedingungen statt: 10 Minuten 25 °C, 60 Minuten 42 °C, 10 Minuten 70 °C.

#### 2.3.3 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Die qPCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR und dient der Quantifizierung der dabei entstehenden DNA nach jedem Amplifikationsschritt. Die Menge des PCR-Produktes wird relativ durch Messung der Fluoreszenz-Intensität mittels eines in dsDNA-interkalierenden Farbstoffes nach jedem Zyklus nachgewiesen.

Eine Liste der Primer für die qPCR befindet sich in Tabelle 4, die jeweils zu einem Primerpaar-Mix gemischt wurden (5 µl Forward-Primer, 5 µl Reverse-Primer und 90 µl Wasser in PCR-Qualität). Ein 20 µl PCR-Ansatz bestand aus 12,5 µl iQ SYBR-Green Mix, 1 µl Primerpaar-Mix, 9 µl RNase freies Wasser und 2,5 µl cDNA (1:5 Verdünnung des Reverse Transkription Ansatzes). Die PCR fand unter folgenden Bedingungen statt:

Tabelle 10: qPCR-Programm

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	3 min
Denaturierung	95	10 s
Hybridisierung	60 (40 Zyklen)	30 s
Extension	72	30 s
Finale Extension	95	2 min
Schmelzkurve	55 → 95	10 s

## 2.4. Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle Zellen, mit Ausnahme der WM278 und 1205Lu, wurden in DMEM *high glucose* unter Zugabe von 10 % FCS unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert und ab einer Konfluenz von 90 % passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie mit 1-2 ml Trypsin bedeckt und bei 37 °C für circa 3 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von Medium wurde das Trypsin inaktiviert, die Zellzahl unter Einsatz einer Neubauer Zählkammer gezählt, die Zellen für folgende Experimente entsprechend ausgesät und für weitere Kultivierung passagiert. WM278 und 1205Lu wurden in Tumormedium (80 % MCDB153, 20 % L-15, 5 µg/ml Insulin, 1,68 mM CaCl<sub>2</sub>) mit 2 % FCS unter Standardbedingungen kultiviert und wie oben beschrieben passagiert.

Für die Aufbewahrung wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt und die Zellsuspension für 3 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend

in DMEM mit 20 % FCS und 5 % DMSO resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden in einer Isopropanol-enthaltenen Einfrierbox bei -80 °C langsam eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen entweder weiterhin bei -80 °C gelagert oder für die Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt und die Zellen in ein Kulturgefäß mit warmem Medium gegeben.

### 2.4.2 Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion von Plasmid-DNA oder siRNA erfolgte je nach Zelllinie mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien nach Herstellerangaben. HEK293T Zellen wurden mit der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Für die Transfektion von siRNA bei MV3 Zellen wurde RNAiMAX verwendet, die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte mit FuGENE und die Plasmid-DNA-Transfektion für SRF-Luciferase-Assays mit LTX.

#### siRNA-Behandlung mit RNAiMAX

Das Prinzip der Transfektion mit Hilfe von RNAiMAX beruht auf der Bildung von RNA/Polymer-Komplexen, die von den Zellen liposomal aufgenommen werden und somit die siRNA in die Zellen bringen.

Für die siRNA-Transfektion wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in eine 6-well oder 12-well Kulturschale auf eine 40 %-ige Konfluenz ausgesät. Für die Transfektion im 6-well-Format wurden in einem jeweiligen Volumen von 250 µl serumfreiem Medium wurden 2,5 µl siRNA (20 µM) und 5 µl RNAiMAX vorgemischt, anschließend zusammengeführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der gebildete siRNA-Transfektionskomplex wurde daraufhin auf die Zellen gegeben und gleichmäßig verteilt. Nach 72 Stunden wurde die Runterregulierung überprüft und die Zellen für weitere Experimente verwendet.

#### Transfektion mit FuGENE

Transiente Transfektion von MV3 Zellen mit FuGENE erfolgte in 15 cm-Kulturschalen. Hierzu wurden je 20 µg Plasmid (pEF.HA-FMNL2, pEF.FLAG-FMNL3 oder pLink-Leervektor) in 1 ml OptiMEM zusammen mit 80 µl FuGENE für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für Ko-Immunpräzipitation genutzt.



### Transfektion mit Lipofectamine LTX

MV3 Zellen wurden für die SRF-Reportergenanalysen mit LTX transfiziert. Zu dem Transfektionsansatz aus 100 µl OptiMEM und 2 µg DNA wurden 2 µl Plus-Reagenz gegeben, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 4 µl LTX-Reagenz dazu pipettiert, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben.

### Calcium-Phosphat-Präzipitation von HEK293T Zellen zur Gewinnung lentiviraler Überstände

Prinzip der Calcium-Phosphat-Transfektion beruht auf der Präzipitation der DNA mit Calciumphosphat in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat, wodurch die DNA von den Zellen internalisiert wird.

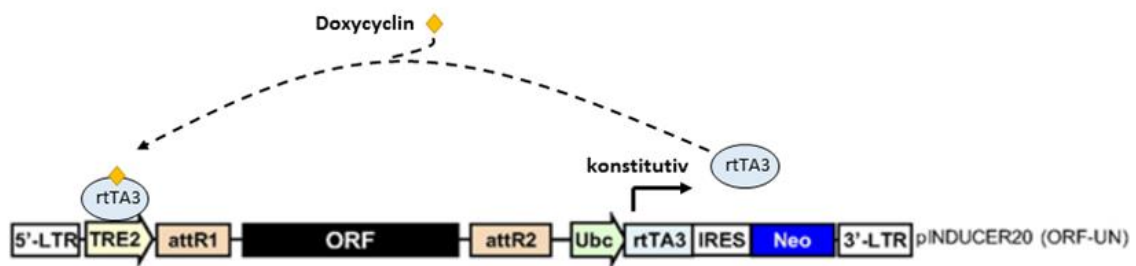
Für die Transfektion von HEK293T in einer 6-well Kulturschale wurden 0,5 µg des zu transduzierenden Plasmids (pGIPZ oder pInducer20) und je 2 µg der lentiviralen Kapselvektoren psPAX und pMDG.2 in 112,5 µl bi-distilliertem Wasser gemischt und 5–10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 125 µl 2X BBS und 12,5 µl CaCl<sub>2</sub> tropfenweise hinzugefügt, der Ansatz gevortext und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben, nach 3 Stunden das Medium gewechselt sowie die Zellen in den S2-Bereich überführt.

### 2.4.3 Generierung stabiler Zelllinien

Der Vorteil der stabilen Transfektion gegenüber der transienten ist dessen zeitliche Unbegrenztheit, bedingt durch den Einbau des genetischen Materials in das Genom der transfizierten Zelle. In den durchgeführten Experimenten wurden das lentivirale Transfektionssystem pInducer20 sowie pGIPZ verwendet. Das pInducer20 (pIND20)-System beruht auf der Doxycyclin-induzierbaren cDNA-Expression und Selektion der transduzierten Zellen über Geneticin (G418) (Meerbrey et al. 2001). Das pGIPZ-System dient dem stabilen *Knockdown* eines gewünschten Proteins. Dabei wird konstitutiv shRNA sowie GFP exprimiert und die Selektion erfolgt über Puromycin. Vor diesem Hintergrund wurden MV3 und Lox Zellen mit kommerziell erworbenen pGIPZ-Konstrukten, welche shRNAs gegen FMNL1, 2 und 3 enthielten, transduziert.

Weiterhin wurden MV3 Zellen mit pInducer20-Vektoren transduziert, die entweder induzierbar GFP-markiertes konstitutiv aktives MAL (MAL $\Delta$ N) oder induzierbar GFP exprimierten.

Hierzu wurden wie oben unter 3.4.2 beschrieben virale Überstände aus HEK293T Zellen gewonnen. Zwei Tage nach der Calcium-Phosphat-Präzipitation der Plasmide wurden die viralen Überstände aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Die Zielzellen wurden mit 1 ml viralem Überstand und 25 µg/ml Polybrene in einer 6-well Kulturschale für zwei bis drei Tage inkubiert. Die Selektion erfolgte wie oben beschrieben durch G418 (bei pInducer20) oder durch Puromycin (bei pGIPZ). Durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin wurde die Genexpression des pInducer20-Systems induziert und der Nachweis der GFP-markierten Proteine konnte durch Immunoblot oder fluoreszenzmikroskopisch erbracht werden. Der Nachweis der Expressionsverminderung durch das shRNA exprimierenden pGIPZ-System erfolgte über Immunoblot-Verfahren mit Antikörpern für die entsprechenden Proteine.



### Abb. 9: Lentivirales Vektorsystem pInducer20

Mit Hilfe des pInducer20-Systems ist es möglich, stabile Zelllinien mit Doxycyclin induzierbarer Expression von gewünschter cDNA zu generieren. Die transduzierten Zellen werden mit G418 selektiert und die Überexpression kann mittels Western Blot oder Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. (modifiziert nach Meerbrey et al., 2001)

#### 2.4.4 Wachstumsassays

##### WST-1 Assay

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der WST-1 Assay (Roche) verwendet. Hierfür wurden die Zellen in entsprechender Dichte in 96-well Platten ausgesät und die Viabilität zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe des *Cell Proliferation Reagent WST-1* gemessen.

Das Prinzip des *WST-1* (*water soluble tetrazolium*) beruht auf dem Nachweis einer intakten Atmungskette. Das mitochondriale Dehydrogenase-System lebender Zellen setzt das schwach rote Tetrazoliumsalz *WST-1* in gelbliches Formazan um. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionsmaxima beider Salze kann die Zahl lebender Zellen spektralphotometrisch am ELISA-Plattenlesegerät gemessen werden.

Zur Quantifizierung der Proliferation auf Plastik wurden Zellen für die verschiedenen Zeitpunkte in Triplikaten ausgesät und das Medium an dem jeweiligen Zeitpunkt entfernt und *Cell Proliferation Reagent WST-1* in DMEM mit 10 % FCS im Verhältnis 1:10 auf die Zellen gegeben. Für den Basalwert wurde diese Lösung in ein leeres Well gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation im Brutschrank wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Zum Erstellen der Proliferationskurven wurden die so erhaltenen Werte nach Abzug der Basalwerte auf den Wert 0 h normiert. Zur Messung des Wachstums auf Platten mit ultra-low attachment surface wurden die Zellen in jeweils einem 24-well Kulturgefäß (ultra-low attachment) pro Zeitpunkt kultiviert. Die Messung der jeweiligen Zeitpunkte erfolgte in Triplikaten in einer 96-well Platte wie oben beschrieben.

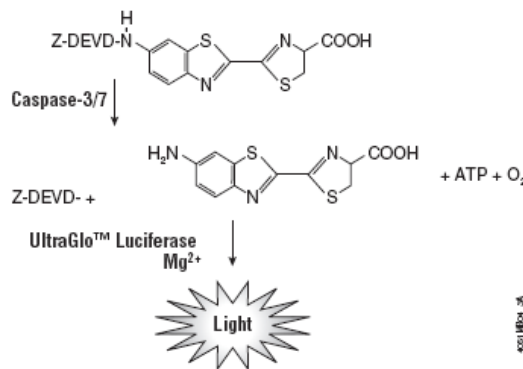
### Soft-Agar Assay

Um die Proliferation unter Bedingungen ähnlich denen *in vivo* zu testen, wurden Soft-Agar Assays durchgeführt (Wellstein et al. 1990). Hierzu wurden die Einzelzellen in ein Agargemisch eingegossen und nach 1–2 Wochen die gebildeten Kolonien quantifiziert. Vorbereitend wurde 2,4 %-iger Agar in destilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert. Unter der Sterilwerkbank wurde ein Wasserbad auf 42 °C erwärmt, worin 10X MEM, das Medium mit 10 % FCS und eine autoklavierte Glasflasche vorgewärmt wurden. Nachdem der Agar in der Mikrowelle aufgeköcht und auf Körpertemperatur abgekühlt wurde, wurden 1,25 ml 10X MEM, 12,5 ml des Agars und 37,5 ml des Mediums in der vorgewärmten Glasflasche gemischt und im Wasserbad bei 42 °C gehalten. Zum Gießen des 0.6 % Bottom-Agars wurde 1 ml des Agargemischs blasenfrei in jeweils ein Well einer 6-well Platte gegossen. Nach dessen Aushärten, wurden die Platten bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Wie unter 3.4.1 beschrieben, wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und 60 000 Zellen/ml in jeweils ein Well einer 12-well Platte vorgelegt und mit Medium auf 1 ml aufgefüllt. In jedes Well mit Zellsuspension wurden 1,5 ml des Agargemischs gegeben, vermischt und je 6-well 750 µl des Zell-Agar-Gemischs blasenfrei auf den Bottom-Agar pipettiert. Die Konzentration des Top-Agars betrug somit 0,36 %. Für jede Zelllinie bzw. Transfektion wurden drei Kulturschalen eines 6-wells verwendet. Die Inkubation

der Soft-Agars erfolgte im Brutschrank unter Normalbedingungen. Zur Normierung des Agars wurde am Tag nach Einsaat die mittlere Zellzahl pro 6-well Kulturschale bestimmt. Hierzu wurden 10 Gesichtsfelder unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt unter Verwendung eines Okulars mit eingraviertem Zählraster. Nach der Quantifizierung von 10 Gesichtsfeldern wurde die mittlere Zellzahl pro 6-well Kulturschale bestimmt. Nach ein bis zwei Wochen konnten Kolonien ausgezählt werden. Hierfür wurden ebenfalls 10 Gesichtsfelder bei 100-facher Vergrößerung durch zwei verschiedene Personen am Lichtmikroskop ausgezählt. Für die Normierung der Kolonienbildung wurde die mittlere Kolonienzahl pro Well durch die initiale Zellzahl dividiert.

### 2.4.5 Apoptose-Assay

Das *Caspase Glo 3/7 Substrate* (Promega) dient der Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität. Die Caspasen 3 und 7 zählen zu den Effektor-Caspasen, die bei ausgelösten Zelltod durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 aktiviert werden. Im Reagenz ist neben dem Aminoluziferin-gekoppelten Caspase-Substrat auch eine Luciferase enthalten. Die Zugabe des Reagenz führt zur Spaltung des darin enthaltenen Caspase-Substrats, wodurch das daran gebundene Aminoluziferin freigesetzt wird. Das freie Aminoluciferin wird von der ebenfalls im Reagenz enthaltenen Luciferase umgesetzt und das entstehende Lumineszenzsignal gemessen. Das erhaltene Signal ist proportional zur Caspase-Aktivität.



#### Abb. 10: Umsetzung des Caspase 3/7 Substrats

Durch aktiviert Caspasen 3 und 7 wird das Caspase-Substrats gespalten und das freiwerdenden Aminoluciferin durch die im *Caspase Glo 3/7 Substrate* enthaltene Luciferase zu Licht umgesetzt (Quelle: Promega, Mannheim)

Zunächst wurden die Zellen zeilenweise in 96-Well-Platten ausgesät. Pro Zelllinie bzw. Transfektion wurde eine Reihe eingesät. Innerhalb einer Reihe wurde jedes zweite Well für die *Caspase 3/7 Substrate*-Messung verwendet. Diese zwischenliegenden Wells dienten der Messung des *Cell Proliferation Reagent WST-1*. Die gleichzeitige WST-Messung wurde für die spätere Normierung der Lumineszenzsignale benötigt. Somit wurden die Caspase-Glo- und die WST-1-Messungen in Triplikaten durchgeführt. Zunächst erfolgte die Messung des *Cell Proliferation Reagent WST-1* wie unter 3.4.4 beschrieben. Anschließend wurde zu den Zellen in den verbliebenen Wells *Caspase 3/7 Substrate* im Verhältnis 1:5 gegeben. Für die Bestimmung des Blankwerts für das *Caspase 3/7 Substrate*, wurde in ein Well ausschließlich Medium mit Substrat im Verhältnis 1:5 pipettiert. Nach einstündiger Inkubation der Platten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden am Luminometer die Signale gemessen. Für die Quantifizierung der Apoptose wurde jedes der drei gemessenen Lumineszenzsignale einer Spalte nach Abzug des Blankwertes auf jeden der drei ermittelten WST-1-Werte normiert und daraus der Mittelwert gebildet. Zur Apoptosemessung der auf Platten mit ultra-low attachment Oberfläche gewachsenen Zellen wurde diese für 72 Stunden auf diesen Platten kultiviert und für die Messung in 96-well Platten überführt.

### 2.4.6 Durchflusszytometrische Analysen

Die Analyse des Zellzyklus sowie die Expression von Integrin  $\beta$ -1 (ITGB1) auf der Zelloberfläche erfolgten mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen.

#### Messung des Zellzyklus mit Propidiumiodid

Die Zellen wurden in 6-well Kulturschalen ausgesät und wie unter 3.4.2 beschrieben mit siRNA transfiziert. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach 72 Stunden auf Platten mit ultra-low attachment Oberflächen transferiert und dort für weiter 72 Stunden kultiviert. Um einen Block in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus zu induzieren, wurden die Zellen mit Nocodazol behandelt. Auf Plastikoberfläche kultivierte Zellen wurden für 16 Stunden und auf Platten mit ultra-low attachment Oberfläche gewachsene Zellen für 20 Stunden mit 100 ng/ml Nocodazol behandelt. Die wie unter 3.4.1 beschrieben hergestellte Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert. Zu dieser Zelllösung wurden 2,5 ml Ethanol gegeben und für 15 Minuten auf Eis fixiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 500  $\mu$ l Propidiumiodid-Färbelösung

aufgenommen und 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml PBS und folgendes Pelletieren (1500 rpm für 5 Minuten) wurde die Färbelösung ausgewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl PBS gelöst und der Zellzyklus mittels Durchflusszytometer gemessen und mit Hilfe der Software Guava easyCyte ausgewertet.

### Bestimmung der Oberflächenexpression von ITGB1

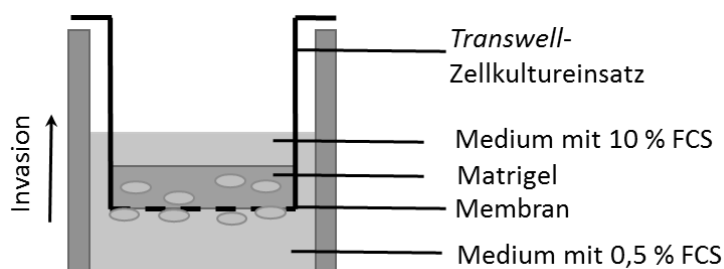
Die Zellen wurden in 6-well Kulturschalen ausgesät und 72 Stunden vor der Messung mit siRNA transfiziert. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach der Transfektion für weitere 72 Stunden auf Platten mit ultr-low attachment Oberfläche kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurden 500 µl 500 mM EDTA in PBS auf die Zellen gegeben und zusammen mit 500 µl PBS bei 900 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde für 10 Minuten mit 100-200 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Zellpellet in 100-200 µl 5 % BSA (in PBS) Blockierlösung resuspendiert und für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurde der ITGB1-Antikörper 1:50 in Blockierlösung verdünnt, die Zellen in 50 µl davon gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde der Sekundärantikörper (A488 mouse) 1:100 in der Blockierlösung verdünnt, das Pellet darin resuspendiert und maximal 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit PBS gewaschen und schließlich in 300 µl PBS aufgenommen, um am Durchflusszytometer gemessen zu werden und mit der Software FlowJo ausgewertet.

## **2.5. Dreidimensionale Invasionsexperimente**

### **2.5.1 Matrigel-Migrationsstudien**

Die Matrigel basierten Invasionsstudien mit WM278 Zellen wurden unter Verwendung von *Transwell*-Zellkultureinsätzen durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl des Wachstumsfaktor reduzierten Matrigels (5 mg/ml) vorsichtig auf die Membran des *Transwell*-Einsatzes aufgetragen und für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ausgehärtet. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 20 000 Zellen/ 50 µl eingestellt und auf die Unterseite der *Transwell*-Membran gesät. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen wurde um die Unterseite des Einsatzes Medium mit 0,5 % FCS gegeben und auf die Oberseite des Einsatzes 10 % FCS-Medium gefüllt. 20 Stunden später wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd

fixiert, 30 Minuten mit 0,3 % Triton X-100 permeabilisiert und über Nacht bei 4 °C wurde das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin und die Zellkerne mit SYTOX-Grün gefärbt. Die Analyse der Assays wurde an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Dabei wurden 8 unterschiedliche, zufällig gewählte Gesichtsfelder mit Hilfe von ImageJ quantifiziert. Dabei wurde das Verhältnis der Zellen auf der Membran und im Matrigel bestimmt. Invadierte Zellen wurden als solche charakterisiert, wenn diese mehr als 5 µm von der Membran entfernt waren. Die Aufnahmen und spätere Rekonstruktionen wurden mit Hilfe der ZEN 2010 Software durchgeführt.



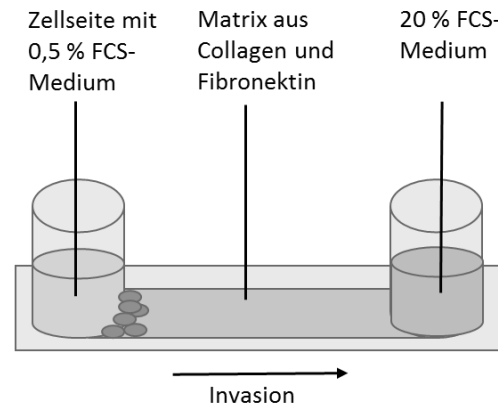
### **Abb. 11: Matrigel-Transwell-Migrationsassay**

Die Zellen wurden auf die Unterseite der porigen *Transwell*-Membran gesät. Die Oberseite der Membran wurde mit Matrigel bedeckt. Aufgrund der Ausbildung eines Serumgradienten invadieren die Zellen durch die Poren in das Matrigel. Die Detektion der invadierten und nicht invadierten Zellen wird nach Fixierung mit Hilfe konfokaler Laser-mikroskopie vorgenommen.

### 2.5.2 Kollagen-Invasionsexperimente

Im Gegensatz zu den *Transwell*-Assays wurden die Kollagen-Invasionsassays als Lebzell-Experimente durchgeführt und die Invasion der Zellen live nachverfolgt. Dafür wurden µ-Slides im 6-channel-Format verwendet. Das Kollagengemisch bestand aus 0,8 mg/ml Kollagen, 10X MEM und HEPES (in H<sub>2</sub>O). Der pH-Wert wurde mit Hilfe von NaOH auf ca. 7,4 eingestellt. Zum Befüllen der Kanäle wurden von diesem Gemisch 600 µl abgenommen, 25 µg/ml Fibronectin zugefügt und auf Eis in die Kanäle der vorgekühlten µ-Slides gefüllt. Die Zellen wurden in dem Fibronectin freien Kollagengemisch aufgenommen auf einer Seite des Kanals ausgesät. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde ein Serumgradient erzeugt, indem auf der Zellseite Medium mit 0,5 % FCS und auf der zellfreien Seite Medium mit 20 % FCS gefüllt wurde. Der

befüllte  $\mu$ -Slide wurde in eine Inkubationskammer eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon) eingesetzt, um die Invasion der lebenden Zellen zu analysieren. Die Auswertung der Zellinvasion erfolgte mittels ImageJ.



### **Abb. 12: Kollagen-Invasionsexperiment**

An die mit einer Kollagen-Fibronectin-Matrix gefüllten Kanäle der  $\mu$ -Slides wird ein Serumgradient erzeugt, indem die Zellseite mit serumfreiem Medium und die gegenüberliegende Seite 20 % FCS-haltiges Medium befüllt wird. Durch die mikroskopische Aufnahme der Invasion können deren Geschwindigkeit, Direktionalität sowie die zurückgelegte Distanz bestimmt werden.

## **2.6. Mikroskopie**

### **2.6.1 Lebendzellmikroskopie**

Die unter 3.5.2 beschriebenen Kollagen-Invasionsexperimente wurden mit Lebendzellmikroskopie durchgeführt, da die  $\mu$ -Slides von ibidi aus einer mikroskopisch hoch auflösbaren Plastikoberfläche bestehen. Nachdem der  $\mu$ -Slide in einer Inkubationskammer eines Fluoreszenzmikroskops platziert wurde, fanden in einem Abstand von 15 Minuten über einen Zeitraum von 16 Stunden Aufnahmen statt. Anschließend wurden die Migrationsgeschwindigkeit, Direktionalität sowie die Invasionsdistanz an jeweils 5 verschiedenen Blickfeldern mit Hilfe der *Manual Tracking Tools* von ImageJ gemessen und quantifiziert.



### 2.6.2 Konfokale Mikroskopie

Die auf Glas-Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 60 Minuten mit Blockierlösung (5 % FCS, 0,3 % Triton X-100 in PBS) inkubiert. Den Waschschritten mit PBS folgte die Inkubation mit dem in Antikörperlösung (1 % BSA, 0,3 % Triton X-100 in PBS) verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und für 60 Minuten mit dem in Antikörperlösung verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper im Dunkeln inkubiert. Weiterhin wurden die Zellkerne mit DAPI und das Aktinzytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss).

### 2.7 Reportergenanalysen

Anhand von Luciferase-basierten Reportergenanalysen kann die transkriptionelle Aktivität eines transfizierten Promotors quantifiziert werden. Gemessen wird hierbei die Aktivität des unter Kontrolle des Promotors stehenden Reportergens. In dieser Arbeit wurde die SRF-abhängige Transkription der Firefly Luciferase untersucht. Der Reporter pGL3D.AFOS wurde genutzt, um die Aktin-regulierte und SRF-abhängige Luciferase-expression zu bestimmen. Dabei wurden die gemessenen Firefly-Luciferase-Werte auf die des kotransfizierten Kontrollreporters pRL-TK (Renilla Luciferase) normiert. Die Reportergenanalysen wurden in MV3 Zellen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit LTX. Pro 6-well Kulturschale wurden 0,1 µg pRL-TK, 0,2 µg pGL3D.AFOS und für die Positivkontrolle 1 µg pEF.mDia1F1F2+C transfiziert. Jeder Ansatz wurde mit pLink-Leervektor auf 2 µg DNA aufgefüllt. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 Stunden starviert und anschließend für 20 Minuten mit 20 % FCS-haltigem Medium stimuliert. Nach insgesamt 24 Stunden wurden die Zellen in Triton-Lysepuffer (Baker and Boyce 2014) aufgenommen. Zu 10 µl Zelllysat wurden für die Messung der Luciferase-Expression 50 µl Firefly Assay Puffer (Baker and Boyce 2014) zugegeben und anschließend 75 µl des Renilla Assay Puffers (Baker and Boyce 2014). Die Messung wurde unter Verwendung eines Luminometers durchgeführt.

## 2.8 Histologie

Immunhistologische Färbungen der Tumore der Mäuse wurden an Paraffinschnitten vorgenommen. Diese wurden über Nacht bei 60 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt, um das Paraffin zu verflüssigen. Verbleibendes Paraffin wurde über eine Alkoholreihe aus den Schnitten entfernt:

Tabelle 11: Absteigende Alkoholreihe

Lösung	Zeit (min)
Xylen I	10
Xylen II	10
Ethanol 100 %	5
Ethanol 100 %	5
Ethanol 90 %	5
Ethanol 70 %	5

Nach dem Waschen in bi-destilliertem H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte 5 Minuten in PBST gewaschen und 10-15 Minuten bei 90 °C in Citratpuffer (9 ml Citratpuffer A + 41 ml Citratpuffer B mit bi-destilliertem H<sub>2</sub>O auf 500 ml) gekocht. Nach 10 minütiger Abkühlung im Citratpuffer, wurden die Schnitte in PBST gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 Minuten bei 4 °C in Peroxidlösung (2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 200 ml PBST) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBST wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit einem DAKO-Stift umrandet und für 60 Minuten in einer Feuchtkammer mit Blockierlösung (2 % BSA in PBST) aufbewahrt. Im Anschluss wurde der PCNA-Antikörper in Blockierlösung 1:250 verdünnt auf die Schnitte gegeben und über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBST wurde der biotinylierte Sekundärantikörper in Blockierlösung 1:500 verdünnt und für 60 Minuten (bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer) auf den Schnitten inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBST gewaschen, die ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Lösung für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben und wieder gewaschen. Das DAB Peroxidasesubstrat wurde für ca. 10 Sekunden auf jeden Schnitt gegeben und mit bi-destilliertem H<sub>2</sub>O abgewaschen, mit Hämalaunlösung für 10 Sekunden gegengefärbt und für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser

gewaschen. Im Anschluss wurde die in Tabelle 11 dargestellte Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen, ein Tropfen Mounting-Medium auf die Schnitte gegeben und diese schließlich mit einem Deckglas bedeckt.

Für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach dem Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe (Tabelle 11) die Färbung durchgeführt: Nach der 2-3-minütigen Färbung mit Hämalaulösung erfolgte das Waschen mit Leitungswasser. Anschließend wurde für 10 Minuten mit Eosin gefärbt und die Alkoholreihe in aufsteigender Reihenfolge durchlaufen.

### **2.9 Statistische Auswertung**

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte (+ SEM). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism. Dabei wurde für den Vergleich von zwei Konditionen der t-Test und für den Vergleich mehrerer Konditionen die einfaktorielle ANOVA verwendet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Die Bedeutung von FMNL1-3 für die Invasivität von Melanomzellen

Bisher wurde die Rolle der Formine in erster Linie in Bezug auf die Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen analysiert. Dabei konnte eine Verbindung zwischen einer verstärkten FMNL2-Expression und der Invasivität und Metastasierung des CRC *in vivo* und *in vitro* hergestellt werden (Zhu, Liang, and Ding 2008; Zhu et al. 2011; Lu et al. 2015; Liang et al. 2013). Allerdings wurde bisher keine umfassende Analyse der funktionellen Relevanz aller drei FMNLs bezüglich der Invasivität durchgeführt.

Da invasive Melanomzelllinien ersten FMNL-Expressionsanalysen zufolge eine erhöhte Expression aller drei FMNLs aufweisen und die Tumorentität zudem durch eine stark ausgeprägte Metastasierung charakterisiert ist, eignet sich das Melanom sehr gut für Untersuchungen des Einflusses von FMNL1-3 auf die Zellinvasivität. Für diese Analysen wurde die FMNL-Expression in Melanomzelllinien durch shRNAs und siRNAs runterreguliert.

#### 3.1.1 Expression von FMNL1-3 in humanen Melanomzelllinien

Erste Analysen der FMNL-Expression und deren Korrelation mit der Invasivität erfolgten mit Hilfe der Online-Datenbank Oncomine. Dort erfolgte anhand von DNA-Microarray-Ergebnissen ein Vergleich der Genexpression von FMNL1-3 in Melanom-Patientenmaterialien mit der in normalem Gewebe. Diese Untersuchungen ergaben, dass in metastasierten Melanomen die Expression von FMNL1 im Vergleich zu normalem Gewebe tendenziell runterreguliert war. Dahingegen zeigte sich für FMNL2 und FMNL3 eine Hochregulierung der Expression in metastatischen Melanomen.

Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen einer verstärkten FMNL2- und FMNL3-Expression und der Invasivität von Melanomzellen zu untersuchen, erfolgten weiterführende Analysen der FMNL-Expressionsniveaus in humanen Melanomzelllinien mit unterschiedlichem invasiven Potential mittels qPCR (nicht gezeigt). Dabei wurde die FMNL-Expression invasiver WM278- und nicht invasiver SbCl2-Zellen mit der von humanen Melanocyten, als Referenz für eine normale FMNL-Expression, verglichen. Wie bereits in den Oncomine-Analysen zeigte sich auch hier eine Korrelation zwischen einer

erhöhten FMNL2- und FMNL3-Expression und der Invasivität der Zellen. So zeigten die invasiven WM278-Zellen im Gegensatz zu den nicht invasiven SbCl<sub>2</sub>-Zellen im Vergleich zu Melanocyten eine erhöhte FMNL2- und FMNL3-Expression.

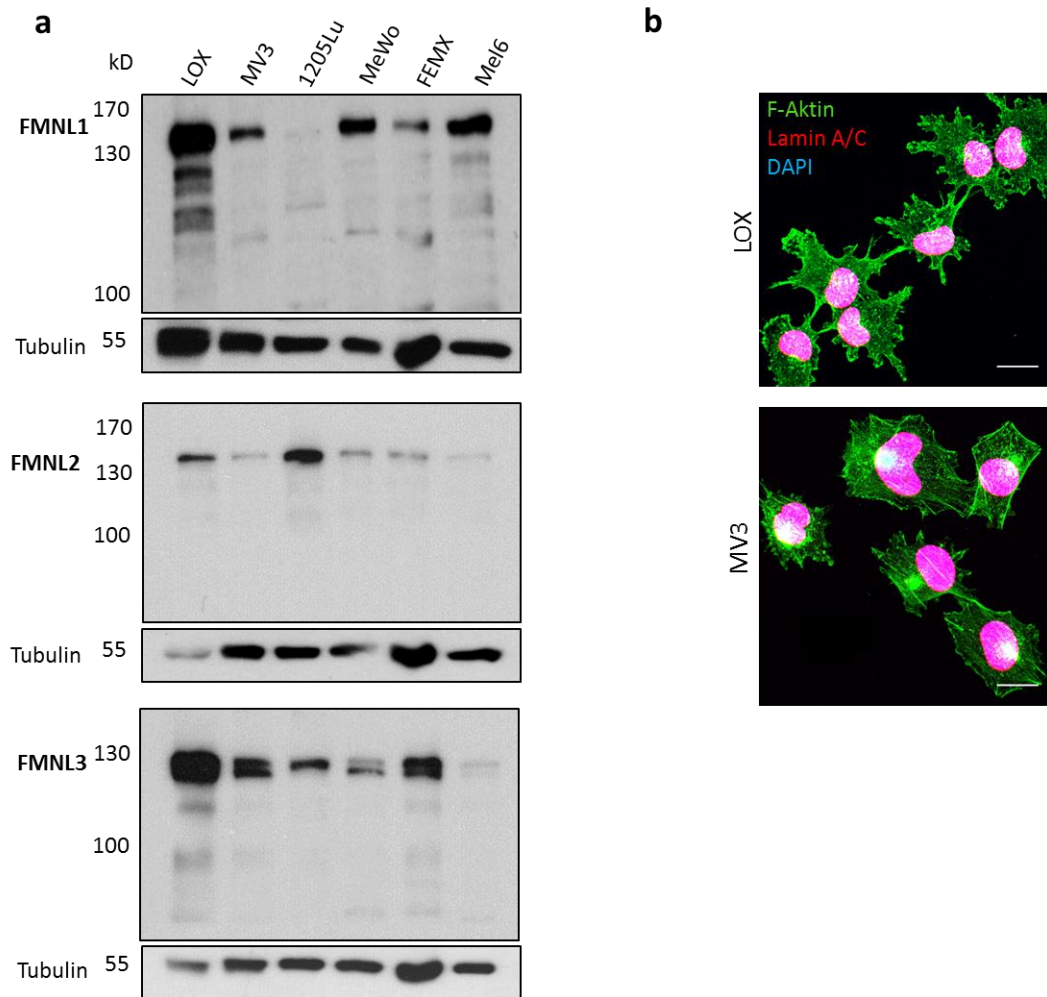
Für weitergehende Expressionsanalysen der FMNLs wurden Western Blot-Analysen in verschiedenen Melanomzelllinien durchgeführt (Abb. 13 a). Diesen Analysen zufolge weisen LOX-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Melanomzelllinien die stärkste Expression aller drei FMNLs auf. Unter Beachtung der schwächeren Tubulin-Bande, zeigten die LOX-Zellen auch die stärkste FMNL2-Expression aller analysierten Zelllinien. Die Western Blot-Untersuchungen identifizierten die MV3- und MeWo-Zellen als Melanomzelllinien mit einem mittleren Expressionsniveau aller drei FMNLs. Dahingegen exprimierten 1205LU nur sehr wenig FMNL1. Mel6-Zellen wiederum zeigten lediglich für FMNL1 eine deutliche Expression, eine schwache FMNL2- und die schwächste FMNL3-Expression aller untersuchten Melanomzelllinien.

Während LOX-Zellen ein hohes Expressionsniveau und MV3-Zellen ein stabiles mittleres Niveau aller drei FMNLs aufweisen, zeigten beispielsweise 1205- oder Mel6-Zellen bei mindestens einem FMNL eine sehr schwache Expression (Tabelle 12). Daher wurden WM289-, LOX- und MV3-Zellen aufgrund ihrer ausgeprägten FMNL-Expression für weiterführende Analysen ausgewählt. Zudem wurden sowohl LOX- als auch MV3-Zellen zuvor als invasiv und im Mausmodell als Tumor-bildend beschrieben (Thies et al. 2007).

Tabelle 12: Invasivität von Melanomzelllinien und ihre FMNL-Expression

Zelllinie	Invasivität	FMNL-Expression		
		FMNL1	FMNL2	FMNL3
<b>LOX</b>	invasiv (Thies et al. 2007)	+++	+++	+++
<b>MV3</b>	invasiv (Thies et al. 2007)	++	+	++
<b>1205Lu</b>	invasiv (Ennen et al. 2015)	-	++	+
<b>Mel6</b>	invasiv (Thies et al. 2007)	+++	-	-

Die Angabe der Invasivität erfolgte nach Thies et al. (Thies et al. 2007) bzw. Ennen et al. (Ennen et al. 2015). Die Beurteilung der FMNL-Expression erfolgte anhand der durchgeführten Western Blot-Analysen (Abb. 13a). Markiert sind die beiden Zelllinien (LOX und MV3), die in nachfolgenden Experimenten verwendet wurden.



**Abb. 13: Expressionsanalysen von FMNL1-3 in Melanomzelllinien**

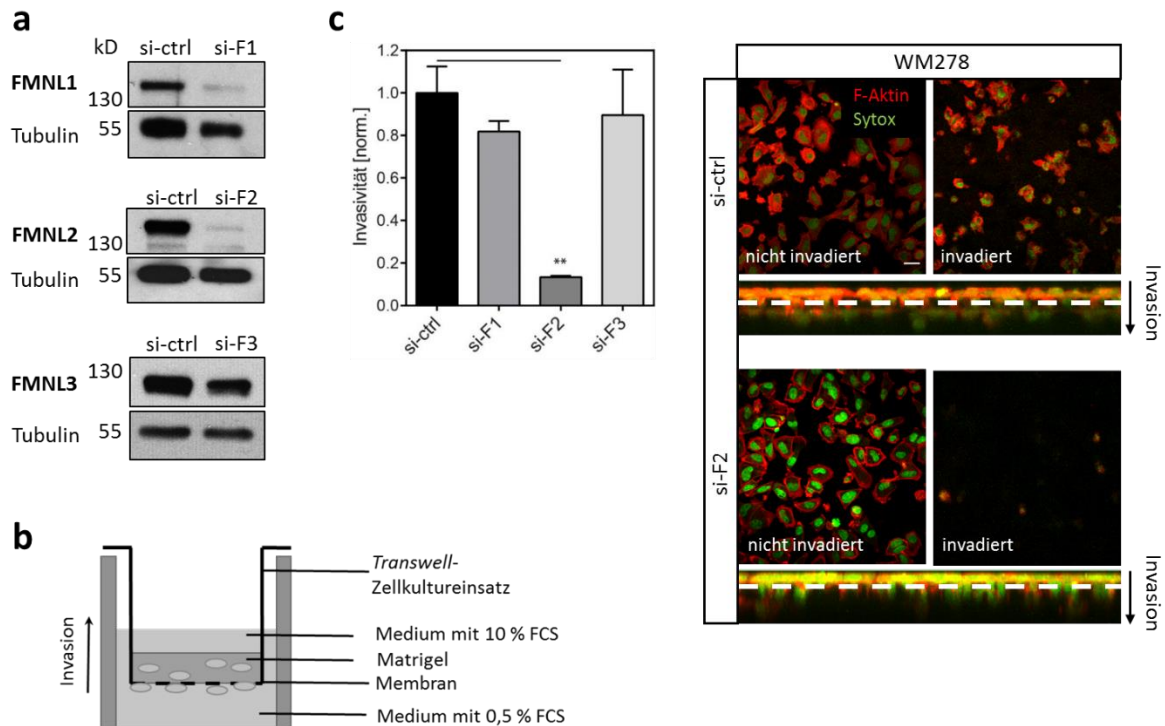
(a) Analyse der Proteinexpression von FMNL1-3 in verschiedenen Melanomzelllinien durch Western Blot Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper für FMNL1, 2 und 3. Als Ladekontrolle diente Tubulin. Die Angabe des Molekulargewichts erfolgte in Kilodalton (kD). (b) Konfokokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Melanomzelllinien LOX und MV3. Die Zellen wurden für Lamin A/C (rot, Alexa Fluor 555), F-Aktin (grün, Phalloidin Alexa Fluor 488) und DAPI (blau) gefärbt. (Skala, 20 μm)

Die Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper erfolgte durch Western Blot Analysen (Abb. 13 a). Während der FMNL2-Antikörper kommerziell erworben wurde, handelt es sich bei den Antikörpern gegen FMNL1 und FMNL3 um ein freundliches Geschenk von D. Billadeau (Mayo Clinic, Rochester). Diese FMNL1- und FMNL3-Antikörper wurden bereits in Publikationen verwendet (Gomez et al. 2007; Colón-Franco, Gomez, and Billadeau 2011) und zeigen spezifische Banden in dem erwarteten kD-Bereich. Aufgrund ihrer eindeutigen Spezifität wird in den folgenden Abbildungen lediglich der Ausschnitt um 130 kD dargestellt.

### 3.1.2 FMNL2 reguliert die Invasionsfähigkeit von Melanomzelllinien

Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Aktinzytoskelett zu modulieren, leisten Formine einen wesentlichen Beitrag zur Migration und Invasionsfähigkeit von Zellen. Für die Formine FMNL1-3 wurde bereits nachgewiesen, dass sie in malignen Erkrankungen überexprimiert und insbesondere bei der Metastasierung des CRC und der Migration leukämischer Zellen von Bedeutung sind (Zhu, Liang, and Ding 2008; Zeng et al. 2015; Favaro et al. 2013). In einer Studie von Kitzing et al. wurde FMNL2 des Weiteren als Treiber der amöboiden Invasion identifiziert (Kitzing et al. 2010).

Im Rahmen dieses Projekts erfolgten die ersten Analysen des Einflusses von FMNL1-3 auf die Invasivität von Melanomzellen in humanen WM278-Zellen. Aufgrund ihrer invasiven Eigenschaften und ihrer starken Expression von FMNL2 und FMNL3 (qPCR-Daten, nicht gezeigt) eigneten sich diese Zellen besonders gut für erste Untersuchungen. In den folgenden Experimenten wurden die WM278-Zellen zunächst mit siRNA gegen FMNL1 (si-F1), FMNL2 (si-F2) und FMNL3 (si-F3) transfiziert und 72 h nach Transfektion deren Invasionsfähigkeit im Matrigel-*Transwell*-Migrationsassay über 20 h untersucht. Mittels Western Blot-Analysen erfolgte die Überprüfung der erzielten Expressionsverminderungen (Abb. 14 a). WM278-Zellen zeigten nach einer Runterregulierung von FMNL2 eine signifikant reduzierte Invasivität (Abb. 14 c). Für FMNL1 und FMNL2 wurde die Expression um etwa 70 % reduziert, wodurch eine vergleichende Auswertung der Invasivität möglich war. Dahingegen konnte lediglich eine 30%-ige Runterregulierung von FMNL3 erzielt werden, weshalb in diesen Experimenten nicht eindeutig festgestellt werden konnte, inwiefern ein *Knockdown* von FMNL3 die Invasivität der Melanomzellen beeinflusste.



**Abb. 14: WM278 Melanomzellen mit verminderter FMNL2-Expression zeigen reduzierte Invasivität im Matrigel.**

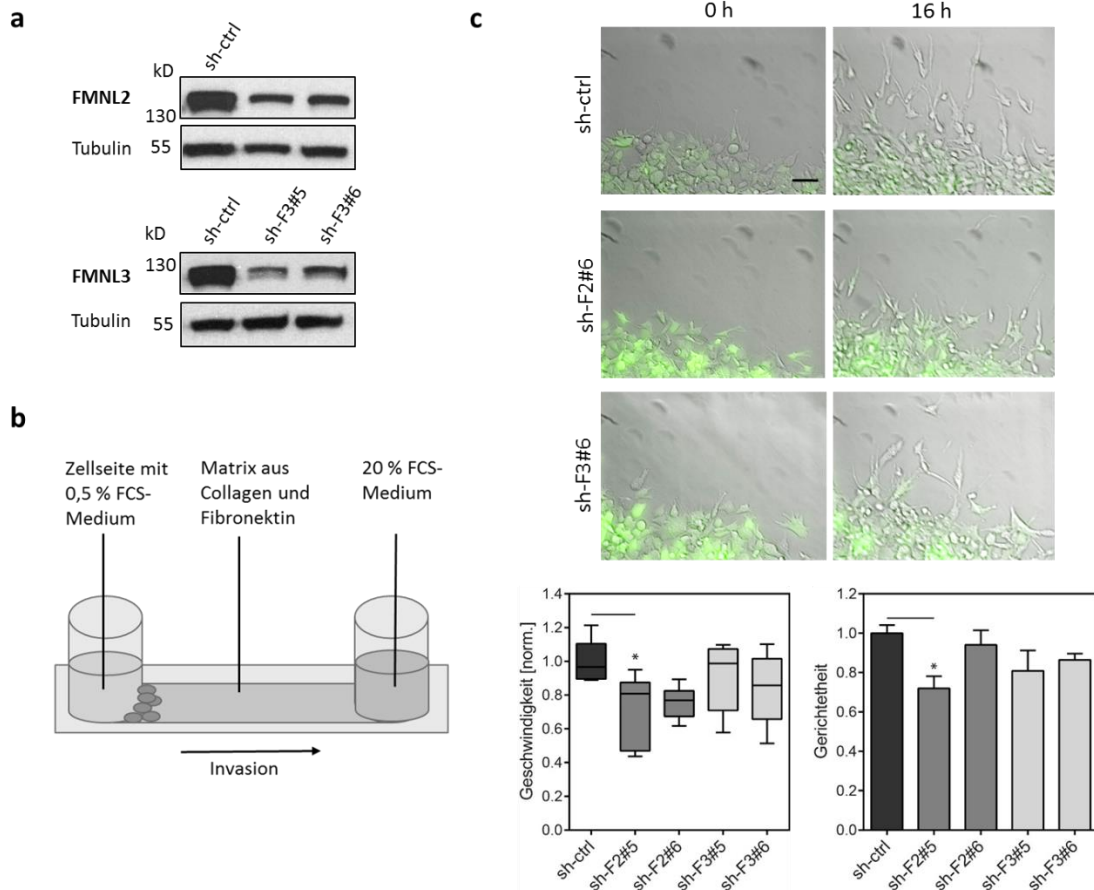
(a) Western Blot-Analyse der Expressionsverminderung von FMNL1-3 in WM278-Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen FMNL1 (si-F1), FMNL2 (si-F2), FMNL3 (si-F3) und Kontroll-siRNA (si-ctrl). Die Lyse der Zellen erfolgte 72 h nach Transfektion. Der Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern für FMNL1, 2 und 3. (b) Schematische Darstellung des Matrigel-Transwell-Migrationsassays. Die Zellen invadieren aufgrund der Ausbildung eines Serumgradienten durch die Poren der Membran in das Matrigel. (c) Quantifizierung der Invasivität von WM278-Zellen mit siRNA-vermittelter Runterregulierung von FMNL1-3 nach 20 h. Die Normierung erfolgte auf die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (si-ctrl) (n = 3; + SEM) \*\* p < 0,01; einfaktorielle ANOVA. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte von Kontrollzellen (si-ctrl) und Zellen mit FMNL2-Knockdown (si-F2). Nicht invadierte Zellen befinden sich auf der Membran. Als invadiert wurden Zellen gezählt, die sich in mindestens 5 µm Entfernung von der Membran im Matrigel befanden. F-Aktin wurde mittels Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit SYTOX-Grün. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Invasion in das Matrigel (siehe Pfeilrichtung) durch die Membran (weiß gestrichelte Linie) ist als Seitenansicht dargestellt. (Skala, 20 µm)

Da der *transwell*-Migrationsassay hinsichtlich der Untersuchung von Geschwindigkeit und Gerichtetheit der Migration limitiert ist, wurden für die weitergehende Analyse der Invasionsfähigkeit Kollagen-Lebendzell-Invasionsexperimente durchgeführt. In diesem Assay wird die Migration lebender Zellen in einer dreidimensionalen Matrix in Echtzeit



verfolgt und später analysiert. Die Durchführung dieses Assays erfolgte mit humanen LOX-Melanomzellen, die eine hohe Expression aller drei FMNLs aufweisen. Da in diesen Zellen keine FMNL-Runterregulierung durch siRNA möglich war, wurden durch lentivirale Transduktion mit shRNA- exprimierenden Plasmiden gegen FMNL2 (sh-F2#5, sh-F2#6) und FMNL3 (sh-F3#5, sh-F3#6) LOX-Zellen mit stabiler FMNL2- und FMNL3-Runterregulation generiert. Neben der Expression von shRNA führten die Plasmide zur Expression von GFP, welches als Marker transduzierter Zellen diente. Es wurde ebenfalls versucht, einen shRNA-vermittelten *Knockdown* von FMNL1 zu generieren. Trotz der Verwendung unterschiedlicher shRNA-Sequenzen konnte jedoch keine Expressionsverminderung von FMNL1 erzielt werden. Da jedoch aufgrund der Ergebnisse der vorhergehenden Matrigel-Invasionsexperimente mit den WM278-Zellen angenommen werden konnte, dass FMNL1 für die Invasivität von Melanomzellen keine Bedeutung hat, wurden die Kollagen-Lebendzell-Invasionsexperimente ausschließlich mit FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung durchgeführt. Mittels Western Blot-Analysen wurde die verminderte Expression von FMNL2 und FMNL3 nachgewiesen (Abb. 15 a).

Die Invasion der LOX-Zellen mit stabiler FMNL2- oder FMNL3- Expressionsverminderung wurden über 16 Stunden in einer Kollagen-Fibronektin-Matrix mit angelegtem Serumgradienten detektiert. Die LOX-Zellen zeigten in dieser Matrix einen mesenchymalen Migrationstyp mit Zellfortsätzen in Richtung des Attraktants (20 % Serum) (Abb. 15 c). Die Analyse der Migration zeigte eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit in Folge einer FMNL2-Expressionsverminderung (sh-F2#5, sh-F2#6) im Vergleich zu Kontrollzellen (sh-ctrl). Die Zellen mit einer reduzierten FMNL3-Expression (sh-F3#5, sh-F3#6) wiesen tendenziell ebenfalls eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit auf (Abb. 15 c, unten links), wobei dieser Effekt weniger deutlich ausgeprägt war als beim FMNL2-*Knockdown*. Bezüglich der Gerichtetheit der Migration ließ sich auch hier ein Trend hinsichtlich einer weniger gerichteten Bewegung der Zellen in Folge einer FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung beobachten (Abb. 15 c, unten rechts).



**Abb. 15: Runterregulierung von FMNL2 reduziert die Migrationsgeschwindigkeit von LOX-Zellen.**

(a) Nachweis des shRNA vermittelten stabilen *Knockdowns* von FMNL2 und FMNL3 in LOX-Zellen mittels Western Blot. Durch Expression von jeweils zwei unterschiedlichen shRNA-Sequenzen erfolgte eine Runterregulierung von FMNL2 (sh-F2#5, sh-F2#6) und FMNL3 (sh-F3#5, sh-F3#6). Als Ladekontrolle diente Tubulin. (b) Schematische Darstellung des Kollagen-Invasionsexperiments. Stimuliert durch die Ausbildung eines Serumgradienten invadieren die Zellen durch den mit einer Kollagen-Fibronectin-Matrix gefüllten Kanal. (c) Repräsentative Ausschnitte von invadierenden LOX-Zellen in der Fibronectin-Kollagen-Matrix. Dargestellt sind Kontrollzellen (sh-ctrl), FMNL2-defiziente LOX-Zellen (sh-F2#6) sowie FMNL3-defiziente LOX-Zellen (sh-F3#6) zu Beginn des Experiments (0 h) und nach 16 h. (Skala, 20  $\mu$ m). Alle 15 Minuten wurden Bilder der Zellen aufgenommen. Die Geschwindigkeit und Gerichtetheit der Zellmigration wurde durch manuelles *tracking* (je 60 Zellen; n = 2) ermittelt. Der Box-Whisker-Plot stellt die Migrationsgeschwindigkeiten mit dem jeweiligen Median und Quartilen dar. \* p < 0,05; einfaktorielle ANOVA. Die Direktionalitäten wurden als Mittelwerte + SEM dargestellt. \* p < 0,05; einfaktorielle ANOVA.

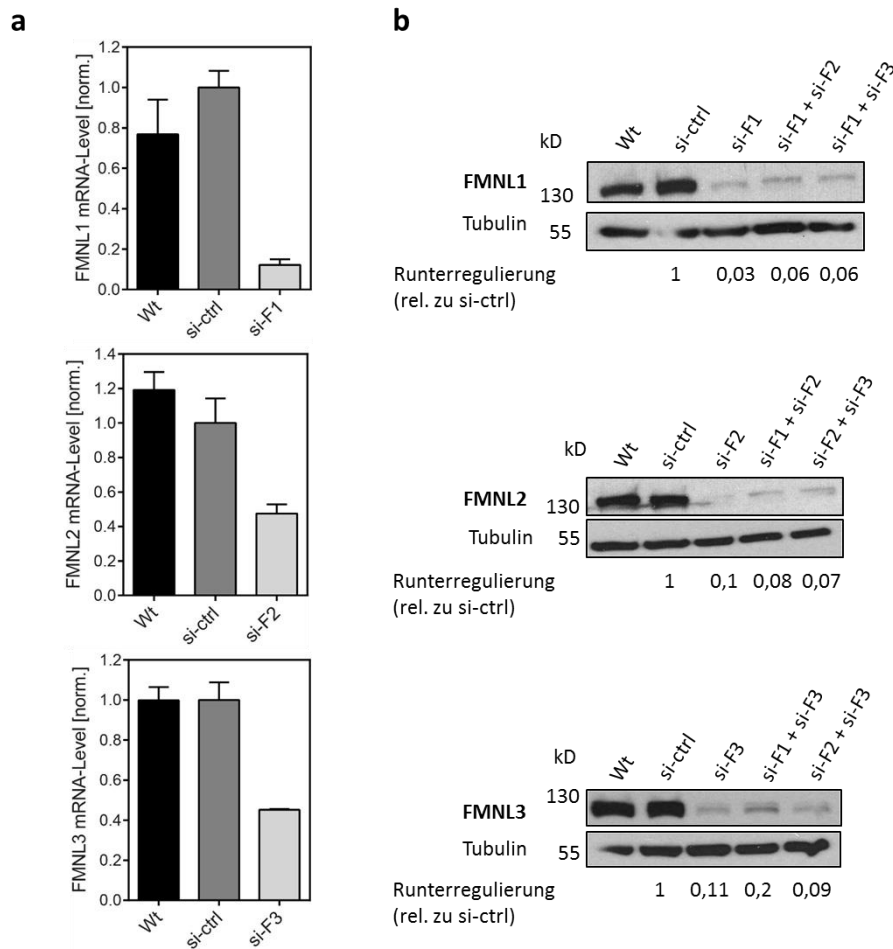
Anhand von zwei verschiedenen Invasionsassays mit unterschiedlichen Melanomzelllinien konnte demnach gezeigt werden, dass lediglich mit einer Reduktion der FMNL2-Expression eine verminderte Invasivität und Migrationsgeschwindigkeit einhergeht. FMNL1 und FMNL3 scheinen demnach für migratorische Prozesse eine untergeordnete Rolle zu spielen.

### 3.2 Charakterisierung der Bedeutung von FMNL1-3 für die Proliferation von Melanomzelllinien

Neben ihrer Bedeutung für die Invasionsfähigkeit von Zellen, wurde den FMNLs auch eine Rolle für die Proliferation verschiedener Tumorzelllinien *in vivo* und *in vitro* zugeschrieben. So bewirkte eine Runterregulierung von FMNL1 in leukämischen Zelllinien eine verminderte Zellproliferation *in vitro* sowie vermindertes Tumorwachstum in Maus-Xenograft-Experimenten (Favaro et al. 2013). Ähnliches konnte für FMNL2 und FMNL3 im CRC gezeigt werden (Zhu et al. 2011; Zeng et al. 2015).

Um die funktionelle Bedeutung von FMNL1-3 bezüglich der Zellproliferation *in vitro* in Melanomzellen zu charakterisieren, wurden zunächst MV3-Zellen mit siRNAs gegen FMNL1-3 (si-F1, si-F2, si-F3) transfiziert. Jeweils 72 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Effizienz der Expressionsverminderung auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 16). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA des jeweiligen FMNLs, als auch das entsprechende Protein durch die siRNA-Behandlung deutlich runterreguliert wurden. Dabei erschien der *Knockdown* auf Proteinebene noch deutlicher. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass auch durch die Kombination von siRNAs gegen zwei verschiedene FMNLs eine deutliche Runterregulierung beider FMNLs erzielt wurde (Abb. 16 b).

Um den Einfluss von FMNL1-3 auf die Proliferationsfähigkeit der MV3-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst das adhärente Wachstum der Zellen mit verminderter FMNL-Expression auf Plastikoberflächen analysiert. Mittels des WST-1 Assays wurde das Zellwachstum über 72 h gemessen (Abb. 17 a). Es zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Proliferation bei Runterregulierung von FMNL3 sowie bei der kombinierten Expressionsverminderung von jeweils zwei FMNLs (si-F1 + si-F2; si-F1 + si-F3; si-F2 + si-F3). Die stärkste Reduktion des Wachstum wurde dabei durch den kombinierten *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) erzielt.

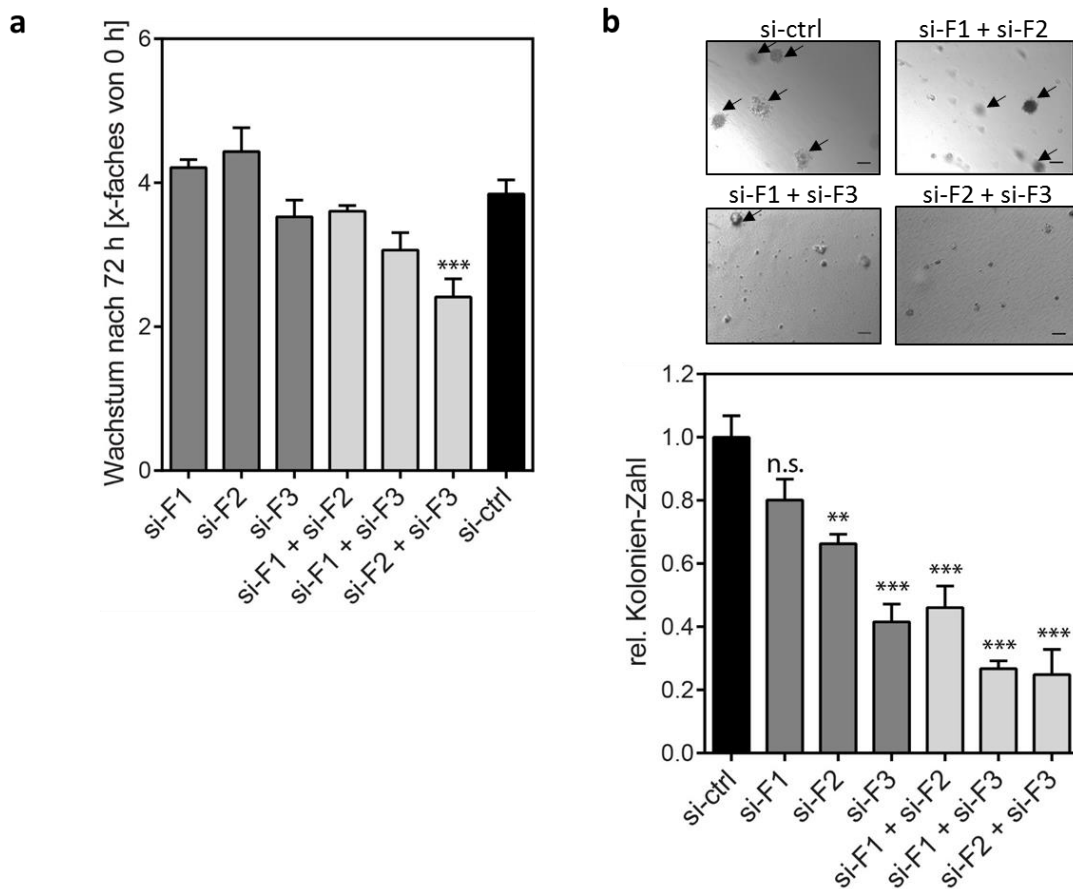


**Abb. 16: Effizienz der siRNA-vermittelten Runterregulierung von FMNL1-3 in MV3-Zellen**

(a) Nachweis der Runterregulierungen von FMNL1 (si-F1), FMNL2 (si-F2) und FMNL3 (si-F3) auf mRNA-Ebene mittels qPCR. Die Expression der jeweiligen mRNAs von FMNL1-3 ist relativ zur Expression von GAPDH als Mittelwert dargestellt und wurde auf die Kontroll-Zellen (si-ctrl) normiert. (n = 2; + SD) (b) Nachweis der verminderten Expression von FMNL1-3 auf Proteinebene mittels Western Blot-Analyse. 72 h nach der einzelnen (si-F1, si-F2, si-F3) oder kombinierten (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) siRNA-Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen. Tubulin diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ebenfalls die densitometrische Quantifizierung der erzielten Expressionsverminderung.

Um jedoch die Wachstumsbedingungen *in vivo* besser nachzuahmen, wurden Soft-Agar Assays durchgeführt. Mit diesem Assay wird die Proliferationsfähigkeit der Zellen unabhängig von Adhäsion untersucht, indem die Fähigkeit der Zellen analysiert wird, aus eingesäten Einzelzellen Kolonien zu bilden. Anhand der Untersuchung der Kolonienausbildung im Soft-Agar wurde der zuvor beobachtete Effekt von verminderter Proliferation

nach FMNL-Verminderung deutlicher. In diesem Assay zeigte lediglich die Runterregulierung von FMNL1 (si-F1) wenig Effekt, wohingegen durch Expressionsverminderung von FMNL2 (si-F2) und FMNL3 (si-F3) und durch alle kombinierten FMNL-Runterregulierungen das Adhäsions-unabhängige Wachstum deutlich reduziert wurde (Abb. 17 b). Wie bereits bei der Proliferation in Zellkulturschalen beobachtet, war auch in diesem Assay der Effekt des Doppelknockdowns von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) mit einer etwa 80%-igen Wachstumsverminderung am stärksten.

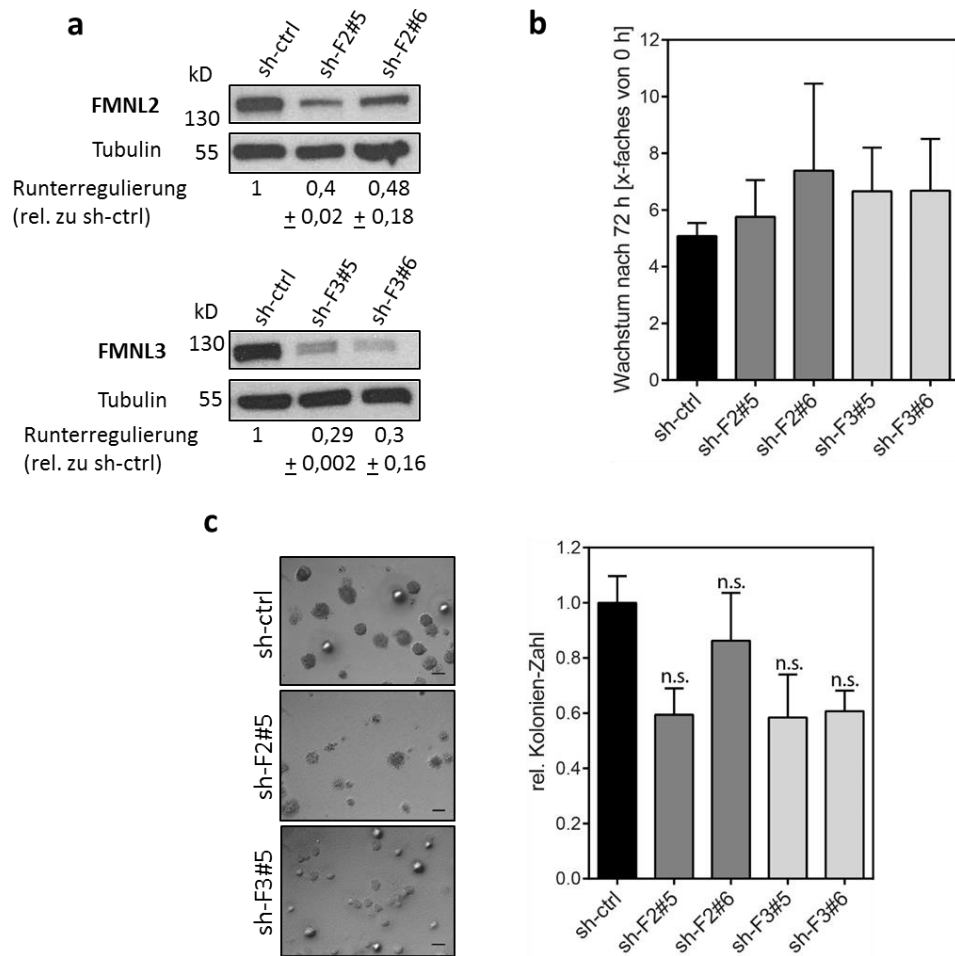


**Abb. 17: Wachstum von MV3-Zellen nach siRNA-vermittelter einzelner und kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3**

**(a)** Quantifizierung des Wachstums der mit FMNL-siRNA-transfizierten MV3-Zellen auf Plastik nach 72 h. Die Messungen erfolgten durch den WST-1 Assay und wurden auf die jeweiligen Werte am Zeitpunkt 0 h normalisiert. (n = 3; + SEM). \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA. **(b)** Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar nach siRNA-vermitteltem Knockdown von FMNL1-3. Repräsentative Ausschnitte der Kolonien 9 Tage nach Ein säen von Einzelzellen. Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen von Kolonien  $\geq 60 \mu\text{m}$  (durch schwarze Pfeile markiert). Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen (si-ctrl). (n = 3; + SEM). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA. (Skala, 50  $\mu\text{m}$ )

### 3.2.2 FMNL2 und FMNL3 beeinflussen das Adhäsions-unabhängige Wachstum.

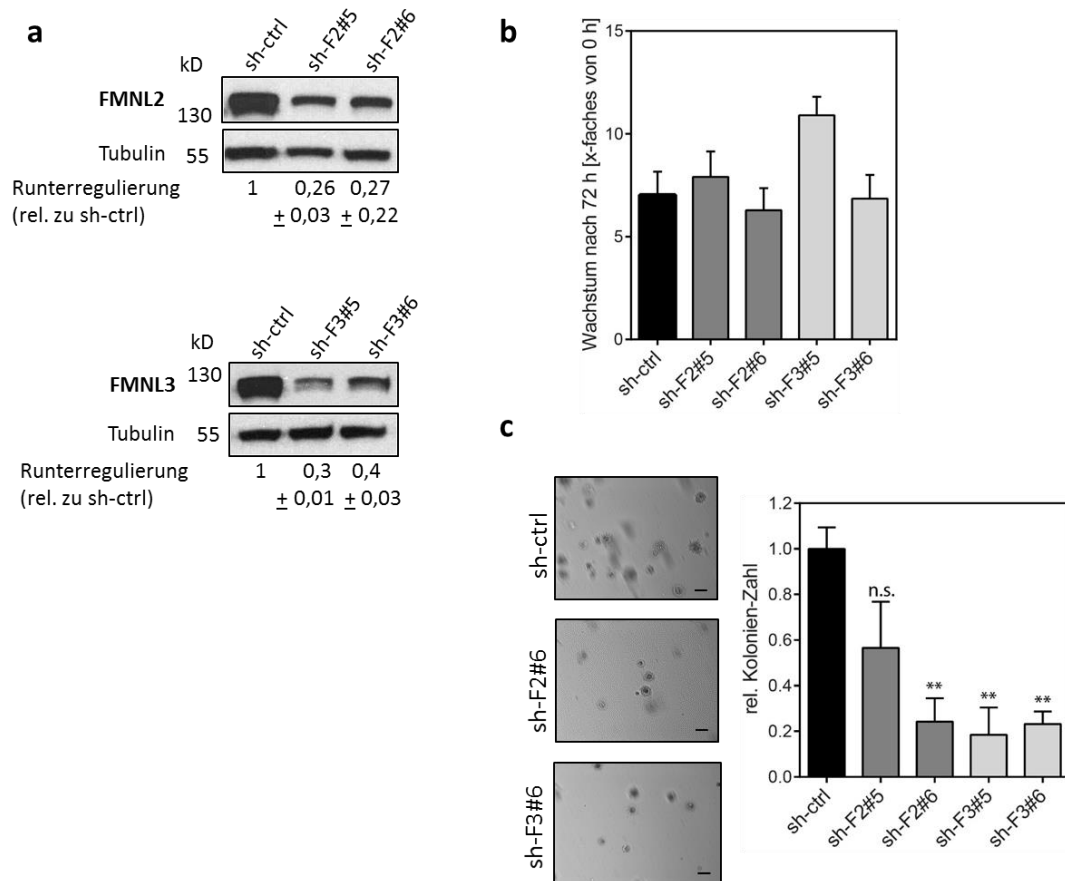
Für die Durchführung von Mausexperimenten, wurden Melanomzellen mit stabilen FMNL-*Knockdowns* generiert. Dies erfolgte über eine lentivirale Transduktion der Zellen mit shRNA- und GFP-exprimierenden Plasmiden. Neben MV3-Zellen wurden auch konstitutiv shRNA-exprimierende LOX-Zellen in Bezug auch ihre Proliferationsfähigkeit nach FMNL-Runterregulierung untersucht. Wie bereits für die LOX-Zellen beschrieben, war es auch bei den MV3-Zellen nicht möglich, eine stabile FMNL1-Expressionsverminderung zu generieren. Da jedoch durch die siRNA-Experimente mit den MV3-Zellen gezeigt wurde, dass FMNL1 weder einen Einfluss auf die adhärente noch auf die Adhäsions-unabhängige Proliferation hat, wurde in den weiteren Experimenten lediglich der Effekt von FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung untersucht. Nach der Bestätigung der Expressionsverminderungen von FMNL2 (sh-F2#5; sh-F2#6) und FMNL3 (sh-F3#5; sh-F3#6) durch jeweils zwei shRNA-Sequenzen in MV3- und LOX-Zellen (Abb. 18 a und 19 a) erfolgte zunächst eine Analyse des Zellwachstums auf Plastik mittels WST-1 Assay. Hierbei konnte in MV3- und LOX-Zellen bestätigt werden, dass ein einzelner *Knockdown* von FMNL2 oder FMNL3 keinen Effekt auf das adhärente Wachstum hatte (Abb. 18 b und 19 b). Da zuvor in den siRNA-transfizierten MV3-Zellen lediglich die kombinierte Runterregulierung der FMNLs einen wachstumsreduzierenden Effekt auf Plastik zeigte, ist anzunehmen, dass die Reduktion des adhärenen Wachstum wesentlich stringenter Bedingungen wie einen Doppel*knockdown* der FMNLs erfordert. Weiterhin führte auch in den stabilen MV3 und LOX eine verminderte Expression von FMNL2 und FMNL3 zu einem reduzierten Adhäsions-unabhängigen Wachstum in (Abb. 18 c und 19 c). Der zu beobachtende schwächere Effekt von sh-F2#6 in den MV3-Zellen (Abb. 18 c) könnte durch die geringere *Knockdown*-Effizienz dieser Sequenz bedingt sein (Abb. 18 a). Das Ausmaß des verminderten Wachstums der stabilen MV3-Zellen im Soft Agar ist vergleichbar mit dem der siRNA-behandelten MV3-Zellen (Abb. 17 b), aber aufgrund der hohen Streuung nicht signifikant. Des Weiteren wurde in LOX-Zellen durch die stabile Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 eine wesentlich stärkere Reduktion des Wachstums von bis zu 80 % im Vergleich zu den Kontrollzellen erzielt (Abb. 19 c) als in MV3-Zellen. Eine mögliche Erklärung für den stärkeren Effekt in LOX-Zellen könnte ihr höheres FMNL2- und FMNL3-Level sein, welches für sie für ein normales Wachstum benötigen und sie somit sensitiver gegenüber einer Runterregulierung macht.



**Abb. 18: Wachstum von MV3-Zellen mit stabiler shRNA-vermittelter Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3**

(a) Western Blot-Analyse der Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 durch stabile Expression von shRNA in MV3-Zellen. Es wurden für die Expressionsverminderung von FMNL2 (sh-F2#5, sh-F2#6) und FMNL3 (sh-F3#5, sh-F3#6) jeweils zwei verschiedene shRNA-Sequenzen verwendet. Die densitometrische Quantifizierung wurde auf die jeweilige Expression in den Kontrollzellen (sh-ctrl) normiert. (b) Quantifizierung des Wachstums von MV3-Zellen mit stabilem *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 auf Plastik nach 72 h. Die Messungen erfolgten durch den WST-1 Assay und wurden auf die jeweiligen Werte am Zeitpunkt 0 h normalisiert. (n = 3; + SEM). (c) Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar bei shRNA-vermittelter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3. Repräsentative Ausschnitte der Kolonien 14 Tage nach Einsäen von Einzelzellen. Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen von Kolonien  $\geq 60 \mu\text{m}$ . Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen (sh-ctrl). (n = 4; + SEM). (Skala, 50  $\mu\text{m}$ )



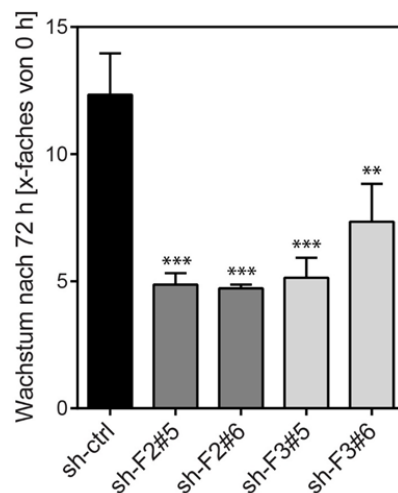


**Abb. 19: Wachstum von LOX-Zellen mit stabiler shRNA-vermittelter Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3**

(a) Western Blot-Analyse der Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 durch stabile Expression von shRNA in LOX-Zellen. Für die Expressionsverminderung von FMNL2 (sh-F2#5, sh-F2#6) und FMNL3 (sh-F3#5, sh-F3#6) wurden jeweils zwei verschiedene shRNA-Sequenzen verwendet. Die Normierung der densitometrischen Quantifizierung erfolgte auf die Kontrollzellen (sh-ctrl). (b) Quantifizierung des Wachstums von LOX-Zellen mit stabilem *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 auf Plastik nach 72 h. Die Messungen erfolgten durch den WST-1 Assay und wurden auf die jeweiligen Werte am Zeitpunkt 0 h normalisiert. (n = 3, + SEM). (c) Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar bei shRNA-vermittelter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3. Repräsentative Ausschnitte der Kolonien 14 Tage nach Einsäen von Einzelzellen. Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopisches Auszählen der Kolonien  $\geq 60 \mu\text{m}$ . Die Normierung erfolgte auf die Kontrollzellen (sh-ctrl). (n = 4; + SEM) \*\*  $p < 0,01$ ; einfaktorielle ANOVA. (Skala, 50  $\mu\text{m}$ )

Aufgrund der Festigkeit der Soft Agar-Matrix ist ein Rauslösen der Zellen ohne deren Beschädigung nicht möglich. Um die Zellen jedoch nach Adhäsions-unabhängigem Wachstum weiterführend zu untersuchen, wurde nach einem Assay gesucht, der das nicht

adhärente Wachstum des Soft-Agars widerspiegelt. Um die zugrunde liegenden Mechanismen für das unterschiedliche Wachstum der Zellen unter Adhäsions-unabhängigen Bedingungen genauer zu untersuchen, wurden die Zellen auf Zellkulturplatten mit einer beschichteten Oberfläche (*ultra-low attachment surface*) von Corning kultiviert. Diese Beschichtung erlaubt lediglich eine minimale Adhäsion der Zellen und das Wachstum der Zellen ist daher mit dem in einer dreidimensionalen Matrix vergleichbar. Zunächst sollte durch die shRNA-exprimierenden LOX-Zellen geprüft werden, inwiefern die Zellen auf diesen Platten wuchsen. Mittels WST-1 Assays konnte gezeigt werden, dass die Zellen auf diesen Platten proliferierten (Abb. 20). Des Weiteren bestätigten die Proliferationsmessungen die Ergebnisse der Soft-Agar Assays: Die Runterregulierungen von FMNL2 und FMNL3 führten zu einer signifikanten Reduzierung des Adhäsions-unabhängigen Wachstums. Somit konnte gezeigt werden, dass ähnliche Wachstumsbedingungen wie im Soft-Agar Assay vorliegen und der Assay zur Analyse des Adhäsions-unabhängigen Wachstums geeignet erscheint.



**Abb. 20: Adhäsions-unabhängiges Wachstum shRNA exprimierender LOX-Zellen auf Zellkulturplatten mit einer ultra-low attachment Oberfläche**

Quantifizierung des Wachstums von LOX-Zellen mit stabilem *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 auf Plastik nach 72 h. Die Messungen erfolgten durch den WST-1 Assay und wurden auf die jeweiligen Werte am Zeitpunkt 0 h normalisiert. (n = 3; + SEM)

\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA.

### 3.3 Funktionelle Bedeutung von FMNL2 und FMNL3 für die Ausbildung und das Wachstum von Tumoren

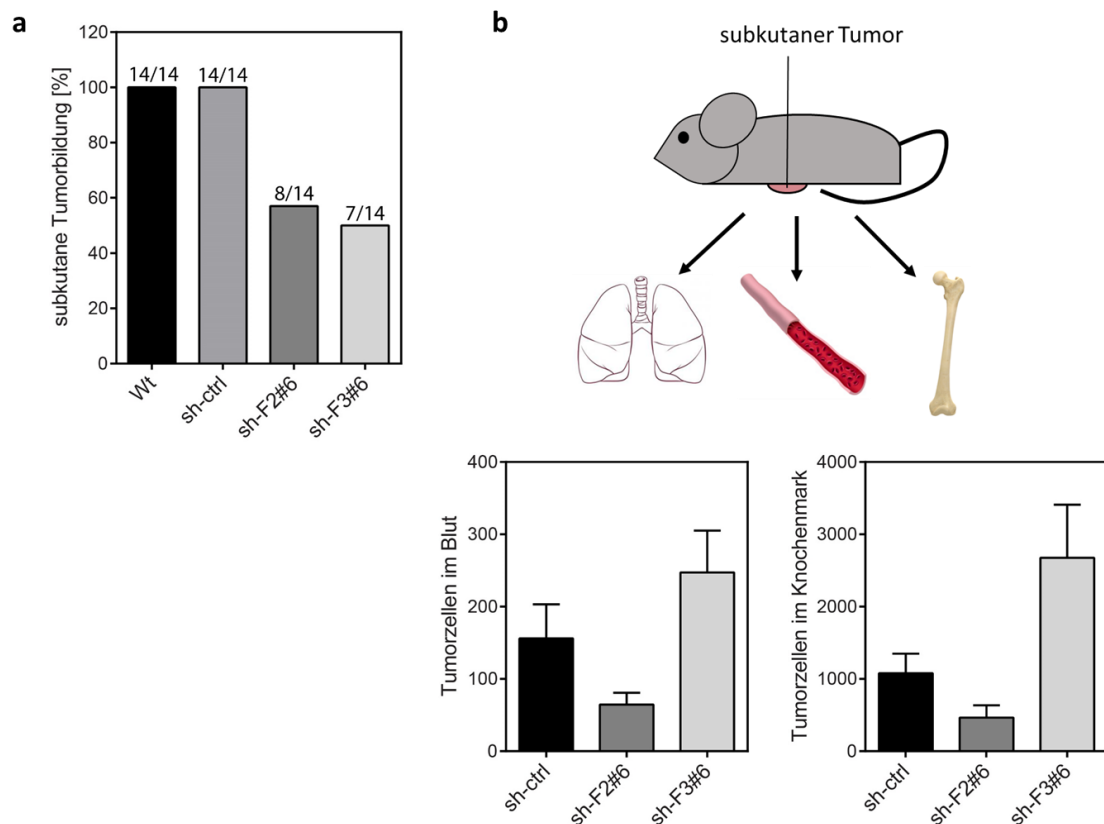
In Mausversuchen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expressionsverminderung von FMNL2 oder FMNL3 sich auf das Tumorwachstum in Mausexperimenten auswirkte. So führte die Runterregulierung des im CRC überexprimierten FMNL2 oder FMNL3 jeweils zu einem verschlechterten Tumorwachstum des CRC (Zeng et al. 2015; Zhu et al. 2011).

Da die vorangegangenen Soft-Agar Assays einen ähnlichen Zusammenhang für Melanomzellen nahe legten, wurde nun geprüft, ob durch einen *Knockdown* von FMNL2 oder FMNL3 in Melanomzellen ein ähnlicher Effekt in Mausexperimenten erzielt werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden zwei unterschiedlich konzipierte Mausexperimente durchgeführt. Beide Mausexperimente wurden von Prof. A. Aigner (Rudolf-Boehm-Institut, Abteilung für klinische Pharmakologie, Universität Leipzig) durchgeführt.

#### 3.3.1 FMNL2- oder FMNL3-Expressionsverminderung reduziert die Bildung subkutaner Tumore

Aufgrund ihrer deutlicheren Effekte im Soft-Agar Assay wurden die stabilen shRNA-exprimierenden LOX-Zellen für die Durchführung des ersten Mausexperiments ausgewählt. Zunächst sollte überprüft werden, inwiefern die beiden Formine FMNL2 und FMNL3 für die Initialisierung solider subkutaner Tumore von Bedeutung sind. Hierfür wurden je  $1 \cdot 10^6$  LOX-Zellen mit einem stabilen FMNL2- oder FMNL3-Knockdown subkutan in beide Flanken athymischer Nacktmäuse injiziert. Folgend wurden die Bildung und das Wachstum der Tumore über einen Zeitraum von 20 Tagen bestimmt. Dabei entwickelten sich bei den Kontrollzellen (sh-ctrl) aus 100 % der Injektionsstellen Tumore, während bei verringerter FMNL2 (sh-F2#6)- oder FMNL3 (sh-3#6)-Expression die Tumorbildungsrate bei lediglich 50 % lag (Abb. 21 a). Interessanterweise zeigten jedoch die gebildeten Tumore unabhängig von einer FMNL2- oder FMNL3-Runterregulierung die gleiche Wachstumkinetik wie die der Kontrollzellen. Daraus lässt sich schließen, dass FMNL2 und FMNL3 besonders für die Initiierung der Tumore von Bedeutung sind, was auf ein Adhäsionsdefizit dieser Zellen hindeuten könnte. In einem anschließenden Expe-

riment wurde die Zahl der von subkutanen Tumoren disseminierten Tumorzellen gemessen (Abb. 21 b). Diese Experimente wurden von Dr. D. Wicklein (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie) durchgeführt. Dabei wurde die Zahl der Tumorzellen im Blut, in der Lunge sowie im Knochenmark durch qPCR quantifiziert (Stübke et al. 2012; Lange et al.). Da das Loslösen einzelner Zellen vom Primärtumor gewisse invasive Eigenschaften voraussetzt, können aus diesen Messungen Rückschlüsse auf die Invasionsfähigkeit der Zellen gezogen werden.



**Abb. 21: *In vivo* Experimente mit FMNL2- und FMNL3-shRNA-exprimierenden LOX-Zellen**

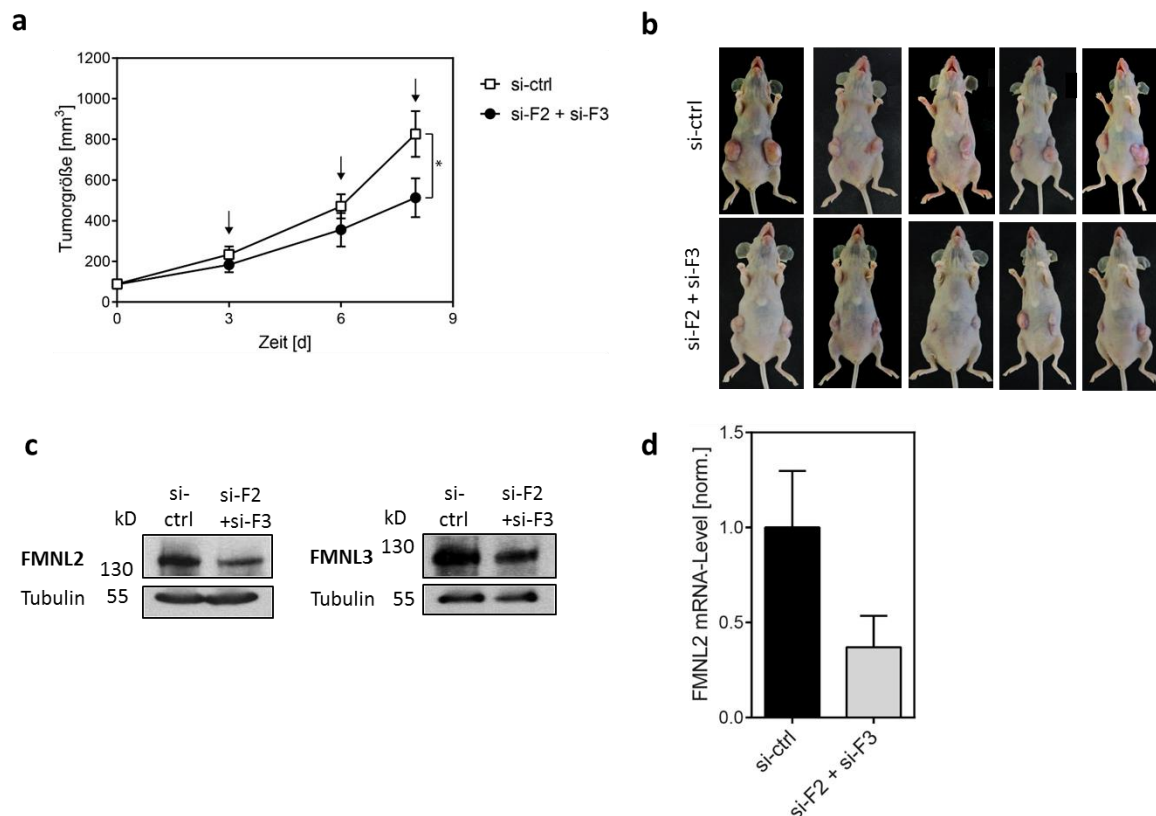
**(a)** Quantifizierung der Ausbildung von Tumoren nach subkutaner Injektion von LOX-Zellen mit verminderter FMNL2- (sh-F2#6) oder FMNL3- (sh-F3#6) Expression. Pro Gruppe wurden 7 Mäuse mit jeweils 2 Injektionsstellen gemessen. Die Zahlen geben die Anzahl der gebildeten Tumore pro Gesamtzahl der Injektionsstellen an. **(b)** Quantifizierung der im Blut und im Knochenmark gemessenen Tumorzellen. 22 Tage nach Ausbildung solider subkutaner Tumore aus den modifizierten LOX-Zellen wurde die Zahl der disseminierten Tumorzellen im Blut und im Knochenmark mittels qPCR bestimmt. Pro Gruppe wurden 10 Tiere verwendet. (n = 10; + SEM)

Die Messung der disseminierten Tumorzellen ergab, dass es eine Runterregulierung von FMNL2 zu einer deutlichen Verringerung dieser Zellen im Blut und im Knochenmark führte (Abb. 22 b). Die Quantifizierung der disseminierten Tumorzellen in der Lunge zeigte ähnliche Effekte (nicht gezeigt). Somit wurden durch diese Ergebnisse die Resultate aus den *in vitro* Invasionsexperimenten, in denen lediglich FMNL2-*Knockdown* zu verringerter Invasivität der Zellen führte, bestätigt.

### 3.3.2 Die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 verringert das Wachstum etablierter Tumore.

Um den wachstumshemmenden Einfluss einer kombinierten FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung *in vivo* zu testen, wurde ein weiteres Mausexperiment durchgeführt, welches eine auf Nanopartikeln basierende, therapeutische Behandlung etablierter Tumore mit siRNA vorsah. Diese Methode beruht auf einer nicht-kovalenten Komplexierung von siRNAs mit dem Polyethylenimin PEI F25-LMW. Die PEI-Komplexe schützen die siRNA vor Degradation, vermitteln ihre zelluläre Aufnahme und intrazelluläre Freisetzung. Weiterhin ermöglichen diese Nano-Komplexe eine systemische Verabreichung und effiziente Abgabe therapeutischer siRNAs *in vivo* (Höbel et al. 2010).

Bei diesem Mausexperiment wurden zunächst MV3-Wildtypzellen subkutan in die Flanken athymischer Mäuse injiziert, aus denen sich Tumore bildeten. Nach der Ausbildung solider Tumore begann die systemische Injektion der PEI/siRNA-Komplexe. Alle zwei Tage wurde eine Gruppe von Mäusen mit Kontroll-siRNA behandelt (si-ctrl) und die andere mit einer Kombination aus siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3). Die Kontrollgruppe (si-ctrl) diente der Kontrolle unspezifischer Effekte der Nanopartikel. Bereits drei Tage nach Behandlungsbeginn wurde ein verlangsamtes Wachstum der mit siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 behandelten Mäuse beobachtet, welches nach 8 Tagen statistisch signifikant war (Abb. 23 a, b). Nachdem die Kontroll-Tumore eine akzeptable Größe erreicht hatten, wurden die Tumore entfernt. Die Analyse der zusammengeführten Tumorlysate jeder Gruppe mittels Western Blot zeigte, dass die systemische PEI/siRNA-Behandlung tatsächlich zu einer reduzierten Expression von FMNL2 und FMNL3 führte (Abb. 23 c), welche ein verringertes Tumorwachstum bedingte. Dies konnte für die FMNL2-Expression durch qPCR der einzelnen Tumore bestätigt werden (Darstellung der Mittelwerte in Abb. 23 d).

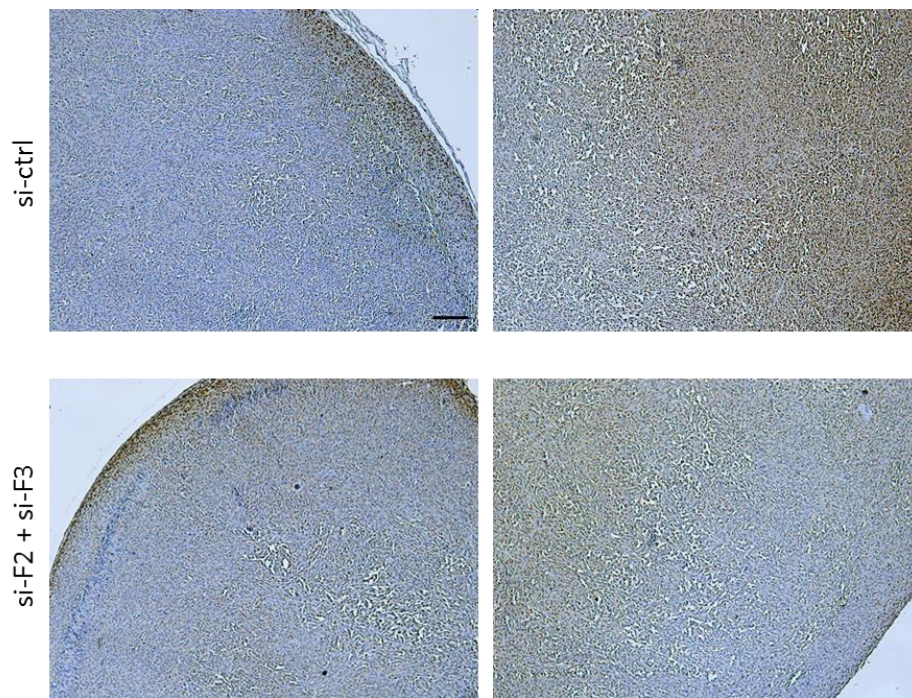


**Abb. 22: Wachstum etablierter MV3-Tumore nach systemischer Behandlung mit PEI/siRNA-Komplexen**

(a) Tumorwachstumskurven ab dem ersten Tag der PEI/siRNA-Behandlung (Tag 0). Die folgenden PEI/siRNA-Behandlungen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Bei jeder Behandlung wurden 15 µg siRNA injiziert. Pro Gruppe wurden 8 Mäuse mit jeweils 2 Injektionsstellen mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) oder kombinierter siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) behandelt. Mittelwert  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ ; t-Test. (b) Repräsentative Bilder von Tumoren der mit PEI/si-ctrl (oben) und PEI/si-F2 + si-F3 (unten) behandelten Mäuse. (c) Western Blot-Analyse der Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 in den Tumoren. Die Detektion erfolgte in den zusammengeführten Tumorlysaten der Kontrollmäuse (si-ctrl) und dem mit FMNL2/3-siRNA behandelten Mäusen (si-F2 + si-F3). (d) Nachweis der verminderten FMNL2-Expression auf mRNA-Ebene mittels qPCR. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelbestimmung jedes Tumors. Die Darstellung der Expression erfolgte relativ zur Expression von GAPDH und auf die Kontrollzellen normiert. (n = 16; + SEM).

Anschließend wurden Paraffinschnitte der Tumore angefertigt und für den Proliferationsmarker *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) gefärbt. Als Gegenfärbung für die Zellkerne diente Hämalaun (Abb. 24). Bezüglich der Morphologie der Tumore wurden keine Unterschiede zwischen den Kontroll-Tumoren (si-ctrl) und denen mit FMNL2- und

FMNL3-Runterregulierung (si-F2 + si-F3) festgestellt. Eine Quantifizierung der PCNA-Färbung war jedoch aufgrund der Heterogenität der Färbung nicht möglich. Es waren allerdings keine offensichtlichen Unterschiede in der PCNA-Färbung zu erkennen, was möglicherweise an den für diese Färbung nicht ausreichend großen Wachstumsunterschieden lag.



**Abb. 23: PCNA- und Hämalaun-Färbung der Tumore**

Aufnahmen von Paraffinschnitten der Tumore nach Hämalaun- und PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)-Antikörper-Färbung. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte durch Hämalaun-Färbung (blau) und die proliferierenden Zellen wurden durch positive PCNA-Färbung (braun) markiert. (Skala, 200  $\mu$ m)

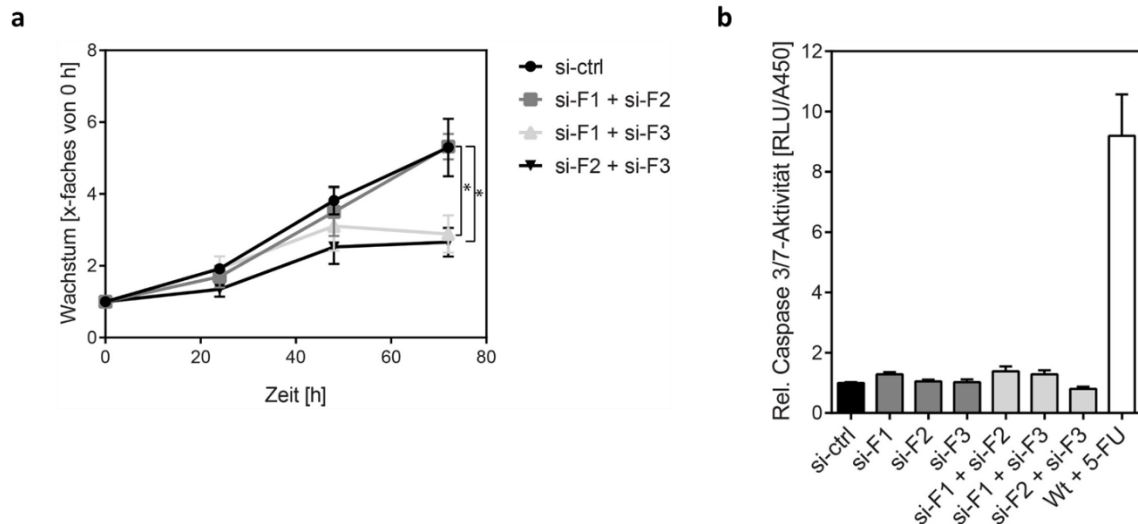
### 3.4 Ursachen für die verringerte Proliferation nach FMNL2- und FMNL3-Expressionsverminderung

Um das reduzierte Wachstum nach Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 und die zugrunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, wurden die Zellen Adhäsions-unabhängig auf Zellkulturplatten mit einer *ultra-low attachment* Oberfläche von Corning kultiviert. Mit Hilfe dieser Platten war es möglich, das Wachstum im Soft-Agar in einem bestimmten Grad nachzuahmen.

Zunächst wurde überprüft, inwiefern die Zellen auf diesen speziell beschichteten Platten wuchsen. Hierfür wurden Kontroll-transfizierte (si-ctrl) und MV3-Zellen mit kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3 (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) auf diesen Platten kultiviert und mittels WST-1 Assays Wachstumskurven erstellt (Abb. 24 a). Es konnte festgestellt werden, dass das Adhäsions-unabhängige Wachstum der Zellen nach 72 h in etwa dem auf Plastik entsprach (Abb. 17 a): Die kombinierte siRNA-Behandlung für eine Runterregulierung von FMNL1 und FMNL3 (si-F1 + si-F3), sowie von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) zeigten einen deutlichen wachstumsvermindernden Effekt im Vergleich zu den Kontrollzellen (si-ctrl).

Folgend sollte geklärt werden, ob das verminderte Wachstum durch einen Anstieg der Apoptose bedingt wurde. Hierfür wurden mit Hilfe des Caspase Glo 3/7 Assay die Apoptoseraten der FMNL-verminderten MV3-Zellen nach 72 stündigem Adhäsions-unabhängigen Wachstum gemessen. Das Prinzip des Caspase Glo 3/7 Assay beruht auf einer Lumineszenz-basierten Aktivitätsmessung der Effektorcaspasen 3 und 7. Als Positivkontrolle wurden MV3-Wildtypzellen mit dem Apoptose-induzierenden 5-Fluoruracil behandelt. Dabei zeigten die Analysen keinen Anstieg der Apoptose der FMNL1-3-defizienten Zellen nach Adhäsions-unabhängigem Wachstum (Abb. 24 b).





**Abb. 24: Adhäsions-unabhängiges Wachstum von MV3-Zellen mit FMNL-Expressionsverminderung auf einer *ultra-low attachment* Oberfläche**

(a) Wachstumskurve der Adhäsions-unabhängigen Proliferation von MV3-Zellen mit kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3 auf Kulturplatten mit *ultra-low attachment* Oberfläche. Die Messungen erfolgten durch den WST-1 Assay. Die Normierung der Werte erfolgte auf den jeweiligen Beginn der Messungen (0h). (n = 3;  $\pm$  SEM).

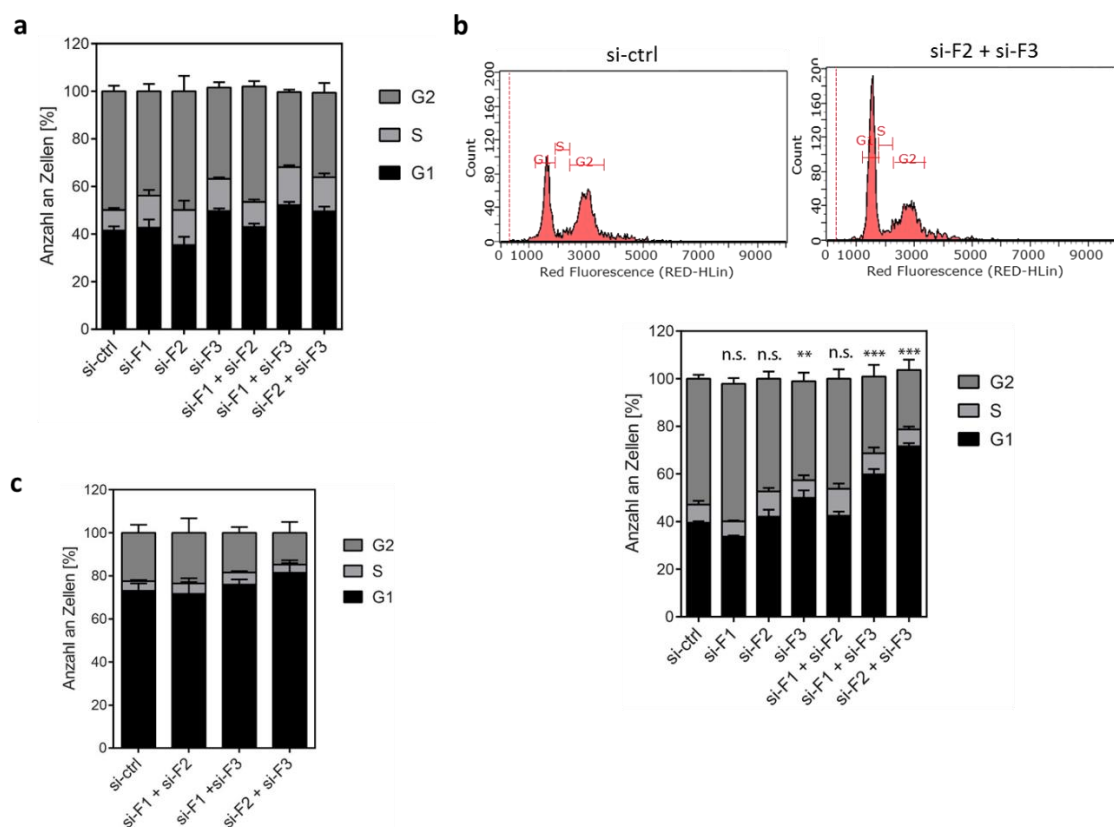
\*  $p < 0,05$ ; einfaktorielle ANOVA. (b) Messung der Apoptoserate von MV3 mit verminderter FMNL-Expression nach 72-stündigem Wachstum auf *ultra-low attachment* Oberfläche. Die Apoptoserate wurde mittels Caspase Glo 3/7 Assay quantifiziert, welches die Aktivität der Caspasen 3 und 7 via Lumineszenz bestimmt. Als Positivkontrolle diente die 72-stündige Behandlung von Wildtypzellen mit 5-Fluoruracil (Wt + 5-FU). Die Werte wurden auf die Zahl lebender Zellen normiert (WST, A450). Dargestellt sind die Werte relativ zu den Kontrollzellen. (n = 4;  $\pm$  SEM)

### 3.4.1 FMNL2 und FMNL3 beeinflussen den Ablauf des Zellzyklus

Da das verminderte Wachstum der in ihrer FMNL-Expression verminderten MV3-Zellen nicht auf eine Zunahme der Apoptose zurückzuführen war, wurde der Zellzyklus als ein weiterer, die Proliferation beeinflussender Faktor untersucht. Die Untersuchung des Zellzyklus erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid.

Für die Analysen wurde zum Teil Nocodazol verwendet, welches einen Block der Zellen in der G<sub>2</sub>-oder M-Phase des Zellzyklus verursacht. Aufgrund dieses Blocks können langsamer proliferierende Zellen besser identifiziert werden, da sie längere Zeit benötigen, um in die G<sub>2</sub>-Phase und somit in den Block zu gelangen. Dementsprechend befinden sich weniger von ihnen im G<sub>2</sub>-Block.

Zunächst wurde der Zellzyklus der MV3 mit einer siRNA-vermittelten FMNL-Expressionsverminderung auf Plastik und Nocodazol-Behandlung untersucht. Dabei stellte sich die Tendenz heraus, dass es nach der Runterregulierung von FMNL3 (si-F3) und den doppelten *Knockdowns* von FMNL1 und FMNL3 (si-F1 + si-F3) sowie von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) zu einer Zunahme der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase kam (Abb. 25 a). Dies reflektierte das verlangsamte Wachstum dieser Zellen auf Plastik. Des Weiteren wurde der Zellzyklus dieser Zellen nach 72-stündigem Adhäsions-unabhängigen Wachstum und Nocodazol-Behandlung analysiert (Abb. 25 b). Hier wurde der Effekt noch deutlicher: Während sich bei den Kontrollzellen (si-ctrl) etwa 40 % der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase befanden, waren es bei den Zellen mit FMNL2- und FMNL3-Expressionsverminderung (si-F2 + si-F3) 70 %. Ein leichter Anstieg der Anzahl von G<sub>1</sub>-Zellen war bereits bei der Runterregulierung von FMNL3 (si-F3) zu beobachten. Auch bei der Runterregulierung von FMNL1 und FMNL3 (si-F1 + si-F3) stieg die Zahl der Zellen in G<sub>1</sub> auf etwa 60 % an.



**Abb. 25: Effekt der FMNL-Runterregulierung auf den Verlauf des Zellzyklus**

(a) Quantifizierung der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analyse durch Propidiumiodid-Färbung. Die Zellen mit siRNA-vermittelter FMNL-Runterregulierung wurden für 72 h auf Plastik kultiviert und 16 h vor der Analyse mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt. Es wurden pro Kondition 20 000 Zellen gemessen. (n = 4; + SEM). (b) Repräsentative Darstellungen der durchflusszytometrischen Propidiumiodid-basierten Zellzyklus-Analyse von Kontrollzellen (si-ctrl) und Zellen mit si-RNA vermitteltem Doppelknockdown von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) nach 72 h Adhäsions-unabhängigem Wachstum auf *ultra-low attachment* Oberfläche. Die Zellen wurden 20 h vor der Analyse mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt. Quantifizierung der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen nach Adhäsions-unabhängigem Wachstum und Nocodazolbehandlung. Pro Kondition wurden 20 000 Zellen gemessen. (n = 4; + SEM). Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte hinsichtlich der G<sub>1</sub>-Werte und in Bezug auf die Kontrollzellen (si-ctrl). \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA. (c) Analyse des Zellzyklus von MV3-Zellen mit kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3. Die Zellen wurden für 72 h auf *ultra-low attachment* Oberfläche kultiviert. Die Messung des Zellzyklus erfolgte ohne vorhergehende Behandlung mit Nocodazol. Pro Kondition wurden 20 000 Zellen gemessen. (n = 4; + SEM).

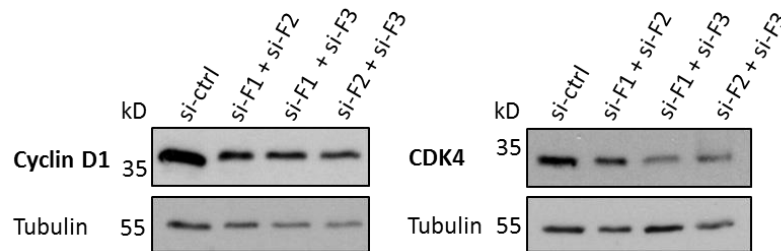
Folgend wurde geprüft, inwieweit dieser Effekt auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen auch ohne induzierten G<sub>2</sub>-Block deutlich wird. Für diese Zellzyklus-Analyse wurden die MV3-Zellen für 72 h Adhäsions-unabhängig kultiviert. Ohne die Behandlung mit Nocodazol war ein tendenziell gleicher, nicht signifikanter Trend bei den MV3 mit einem Doppelknockdown von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) in Form eines etwa 10%-igen Anstiegs der Zellen in G<sub>1</sub> zu beobachten (Abb. 25 c).

Zur weiteren Untersuchung dieses Anstiegs der Zellzahl in G<sub>1</sub> nach kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3, wurde die Expression der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und CDK4 untersucht. Diese beiden Proteine kontrollieren das Fortschreiten des Zellzyklus, indem sie den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus regulieren.

Aus den gemittelten densitometrischen Auswertungen der Western Blot-Analysen wurde deutlich, dass die kombinierte Runterregulierung von FMNL1-3 bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum zu einer reduzierten Expression der beiden Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und CDK4 führte (Abb. 26). So wurde die Expression von Cyclin D1 bei kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) um circa 50 % und die CDK4-Expression um etwa 46 % vermindert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kombinierte Expressionsverminderung von FMNL1-3 bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum zu einer verminderten Expression von Cyclin D1 und CDK4 führt, was vermutlich den Übergang der Zellen von der G<sub>1</sub>- in

die S-Phase des Zellzyklus vermindert und somit zu einem Anstieg der Zellzahl in G<sub>1</sub> führt.



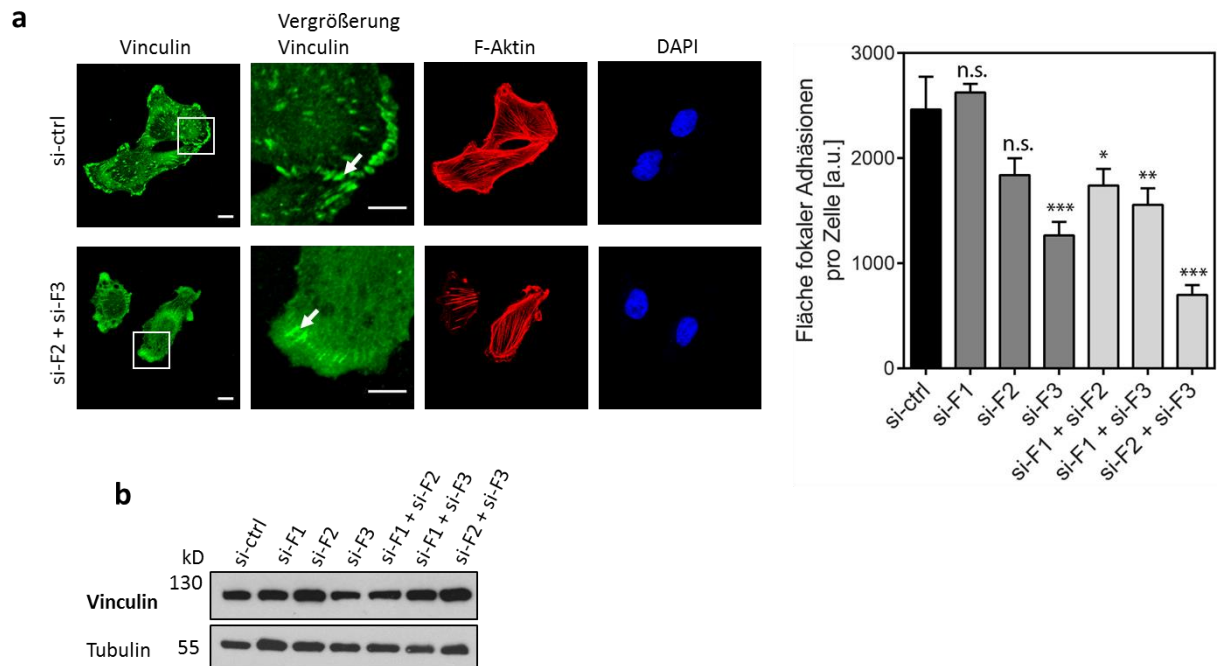
**Abb. 26: Expression der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 und CDK4 in MV3-Zellen**

Western Blot-Analyse der Expression von Cyclin D1 (links) und CDK4 (rechts). Die Ly-sate der MV3-Zellen mit kombinierter Runterregulierung von FMNL1-3 wurden nach 72-stündigem Adhäsions-unabhängigen Wachstum auf *ultra-low attachment* Oberflächen gewonnen. (n = 3)

### 3.4.2 FMNL2 und FMNL3 sind bedeutend für die Integrität fokaler Adhäsionen.

Da die bisher beobachteten Effekte bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum der Zellen stärker ausgeprägt waren, wurde nach zellulären Strukturen gesucht, welche die Zellproliferation durch Umwandlung von EZM-Zell-Wechselwirkungen in intrazelluläre Signale regulieren. Dies ist eine wichtige Aufgabe der fokalen Adhäsionen (FA), deren Abhängigkeit von Forminen bei der Zellmigration bereits gezeigt wurde (Yamana et al. 2006; Gupton et al. 2007).

Als Marker für FAs wurde Vinculin in fixierten MV3-Zellen mit runterregulierter FMNL-Expression gefärbt. Dabei wurde der auffällige Phänotyp beobachtet, dass bei kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) die Lokalisation von Vinculin an FAs drastisch reduziert war (Abb. 27 a). Die Quantifizierung der konfokalen Bilder von MV3-Zellen mit siRNA-vermittelter Runterregulierung von FMNL1-3 zeigte, dass lediglich die Runterregulierung von FMNL1 keinen Effekt auf die Vinculin-Verteilung zeigte, während die Runterregulierung von FMNL3 (si-F3) und die kombinierte Runterregulierung von FMNL1-3 (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) zu einer signifikanten Reduktion von Vinculin an FAs führte (Abb. 27 a, rechts).



**Abb. 27: Vinculin-Verteilung in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression**

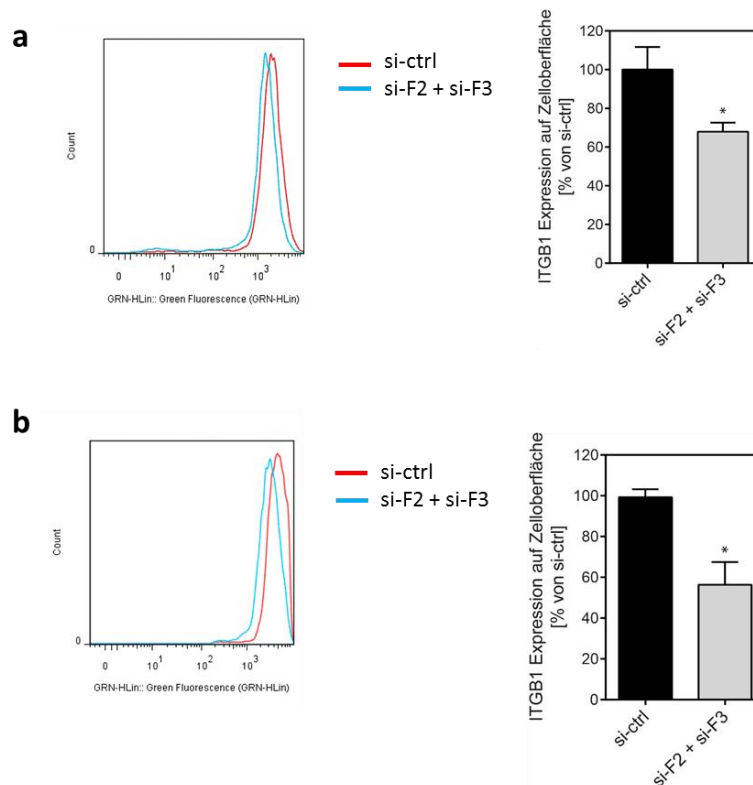
(a) Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen von MV3-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) und siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3). Die Zellen wurden für Vinculin (grün, Alexa Fluor 488), F-Aktin (rot, Rhodamin-Phalloidin) und DAPI (blau) gefärbt. (Skala links, 10  $\mu$ m; Skala in Vergrößerung Vinculin, 5  $\mu$ m). Fokale Adhäsionen wurden durch positive Vinculin-Färbung (siehe weiße Pfeile) definiert und die Fläche fokaler Adhäsionen quantifiziert. Pro Kondition wurden > 54 Zellen analysiert. (n = 3; + SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA. (b) Western Blot-Analyse der gesamten Vinculin-Expression von siRNA-behandelten Zellen nach 72-stündigem Adhäsions-unabhängigen Wachstum.

Daraufhin sollte überprüft werden, inwiefern dieses Defizit von Vinculin an FAs auf eine verringerte Gesamtexpression von Vinculin in den Zellen zurückzuführen ist. Durch Western Blot-Analyse von Gesamtzell-Lysaten der FMNL-defizienten, Adhäsions-unabhängig gewachsenen MV3-Zellen wurde deutlich, dass die Vinculin-Expression der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (si-ctrl) unverändert war (Abb. 27 b).

Da kein Defekt in der Vinculin-Expression vorlag, sind mögliche Erklärungen des Phänotyps ein Defekt der Vinculin-Rekrutierung an FAs oder eine mangelnde Ausbildung

von FAs. Um letzteres zu überprüfen wurden durchflusszytometrische Analysen der Integrin  $\beta$ -1 (ITGB1)-Expression an der Oberfläche von MV3 Kontroll-Zellen (si-ctrl) und MV3-Zellen mit verminderter FMNL2- und FMNL3-Expression (si-F2 + si-F3) durchgeführt. Dabei wurde sowohl die ITGB1-Oberflächenexpression von auf Plastik gewachsenen Zellen (Abb. 28 a) als auch von Adhäsions-unabhängig auf *ultra-low attachment* Oberfläche kultivierten Zellen gemessen (Abb. 28 b). Unter beiden Bedingungen wurde eine signifikante Reduktion der ITGB1-Expression bei *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) im Vergleich zu Kontroll-Zellen (si-ctrl) festgestellt. Diese Verringerung war zudem bei Adhäsions-unabhängig gewachsenen Zellen mit 40 % etwas stärker ausgeprägt als bei adhärenz gewachsenen Zellen.

Obwohl die FA-Zahl von auf Plastik gewachsenen Zellen bei einem *Knockdown* von FMNL2 und FMNL3 etwa gleich stark reduziert war wie bei Adhäsions-unabhängig gewachsenen Zellen, wurde bei dem adhärenz Wachstum ein geringerer Effekt auf die Proliferation beobachtet. Dies könnte daran liegen, dass die Signalgebung anderer Rezeptoren bei adhärenz Wachstum in Teilen ausreicht, die reduzierten FA-Signalkaskaden zu kompensieren.

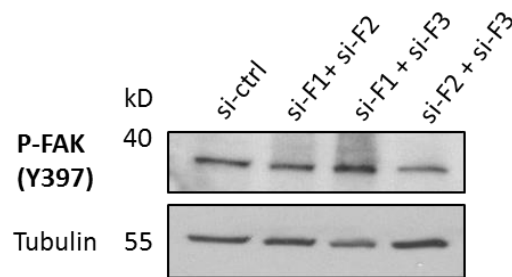


**Abb. 28: Expression von Integrin  $\beta$ -1 (ITGB1) auf der Oberfläche von MV3-Zellen**

**(a)** Durchflusszytometrische Untersuchung der ITGB1-Oberflächenexpression nach Wachstum auf Plastik. Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von MV3-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) und siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) und 72-stündigem Wachstum auf Plastik. Quantifizierung der Analysen. Pro Kondition wurden insgesamt 40 000 Zellen gemessen. (n = 4; + SEM). \*  $p < 0,05$ ; t-Test. **(b)** Durchflusszytometrische Analyse der ITGB1-Oberflächenexpression nach Adhäsions-unabhängigem Wachstum. Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung von MV3-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) und siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) und 72-stündigem Adhäsions-unabhängigem Wachstum auf *ultra-low attachment* Oberfläche. Quantifizierung der Analysen. Pro Kondition wurden insgesamt 40 000 Zellen gemessen. (n = 4; + SEM). \*  $p < 0,05$ ; t-Test.

Neben strukturgebenden Proteinen wie Vinculin befinden sich in fokalen Adhäsionen viele signalübertragende Proteine wie die Tyrosinkinasen Src oder FAK (*focal adhesion kinase*), die durch verschiedene Signalwege die Dynamik fokaler Adhäsionen sowie zelluläres Verhalten regulieren. Durch Integrinbindung an Liganden kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung von FAK an Tyrosin 397 (Y397), was zu einer Bindung der Kinase Src führt. Durch weitere Phosphorylierung durch Src kommt es zu einer zusätzlichen Aktivierung von FAK. Folgend sollte der Effekt der verminderten ITGB1-Oberflächenexpression nach FMNL2/3-Runterregulierung auf die initiale Autophosphorylierung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden MV3-Zellen mit siRNA gegen FMNL1-3 behandelt und für 72 h Adhäsions-unabhängig kultiviert. Eine Western Blot-Analyse der Zelllysate zeigte jedoch keine eindeutigen Unterschiede in der Phosphorylierung von FAK (Abb. 29), die mit dem verminderten Adhäsions-unabhängigen Wachstum der Zellen korrelierten. Die beobachteten Effekte des *Knockdowns* von FMNL2 und FMNL3 könnten jedoch auch durch die Kinase Src vermittelt werden, die u.a. für die Regulierung des FA-Umsatzes von Bedeutung ist (Wozniak et al. 2004).

Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass FMNL2 und besonders FMNL3 wichtige Faktoren für die Integrität von FAs darstellen. Dabei führt die verminderte Ausprägung von FAs unter nicht adhärenen Wachstumsbedingungen zu einer Verlangsamung des Zellzyklus und folgend zu einer verminderten Proliferation der FMNL-defizienten Zellen. Während FMNL2 für die Invasivität von Zellen bedeutend ist, scheint bei den Proliferationsprozessen FMNL3 das wesentliche der drei FMNLs zu sein.



**Abb. 29: Phosphorylierung der focal adhesion kinase (FAK) in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression**

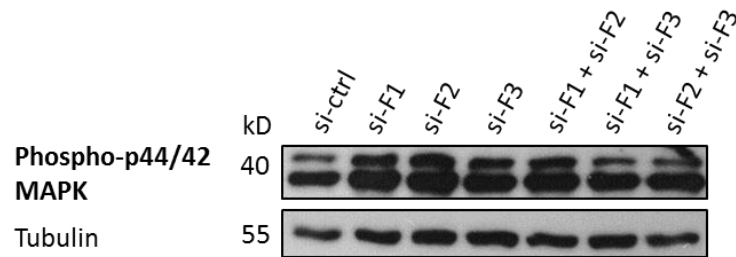
Western Blot-Analyse der aktivierenden Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 397 (Y397) durch Integrine. Gezeigt sind Lysate von Adhäsions-unabhängig gewachsenen MV3-Zellen mit siRNA-vermittelter kombinierter Expressionsverminderung von FMNL1-3.

### 3.4.3 Die Runterregulierung von FMNL1-3 beeinflusst nicht den MAP-Kinase-Signalweg.

Um festzustellen, ob andere für die Zellproliferation wichtige Signalwege durch die FMNL-Expressionsverminderung betroffen sind, wurde exemplarisch der MAP-Kinase (*mitogen-activated protein*)-Signalweg untersucht. Bei dem MAPK-Signalweg kommt es nach Rezeptorstimulation durch Wachstumsfaktoren oder Mitogene nach einer Phosphorylierungskaskade verschiedener Kinasen schließlich zur Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, welche die Zellproliferation, -teilung und -differenzierung reguliert.

Zu diesem Zweck wurden Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern für die aktivierte, phosphorylierte Form der MAPK (ERK1/2) durchgeführt (Abb. 30). Dafür wurden die FMNL-Expressionen durch siRNA-Behandlung einzeln (si-F1, si-F2, si-F3) oder kombiniert (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) runterreguliert und die Zellen für 72 h Adhäsions-unabhängig auf Platten mit *ultra-low attachment* Oberfläche kultiviert.





**Abb. 30: Phosphorylierung der MAP-Kinase (MAPK) in MV3-Zellen mit verminderter FMNL-Expression**

Western Blot-Analyse der Phosphorylierung der MAPK in MV3-Zellen. Die Zellen wurden nach einfacher (si-F1, si-F2, si-F3) oder kombinierter (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) Behandlung mit siRNA gegen FMNL1-3 für 72 h Adhäsions-unabhängig kultiviert.

Die Analyse der Western Blots zeigte keine Veränderung in der Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 nach FMNL-*Knockdown*. Für eine weiterführende Betrachtung dieses Signalweges und um eventuelle feine Unterschiede feststellen zu können, sollten die Zellen vor der Western Blot-Analyse der MAPK-Phosphorylierung zunächst starviert und anschließend mit Wachstumsfaktoren oder Serum stimuliert werden. Es wurde im Rahmen dieses Experiments versucht, eine Starvierung der MV3-Zellen zu erzielen. Es gelang allerdings nicht, die MAPK-Phosphorylierung durch Serumstarvierung der Zellen zu reduzieren, was vermutlich auf die aktivierende N-Ras-Mutation zurückzuführen ist, welche die MV3-Melanomzelllinie trägt.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass unter nicht starvierten Bedingungen und bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum der Melanomzellen die MAPK-Signalkaskade durch FMNL-Runterregulierung nicht deutlich beeinflusst wird. Daher ist zu vermuten, dass das reduzierte Wachstum nach FMNL-Runterregulierung hauptsächlich durch die verminderte FA-Signalgebung bedingt wird.

### 3.5 Hetero-Dimerisierung von FMNL2 und FMNL3

Aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenzhomologie liegt die Vermutung nahe, dass FMNL2 und FMNL3 zur Ausbildung von Hetero-Dimeren in der Lage sind. Auch unsere bisherigen Ergebnisse lassen zumindest synergistische Effekte der beiden Formine vermuten, da die kombinierte Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 stets den stärksten Effekt zeigte.

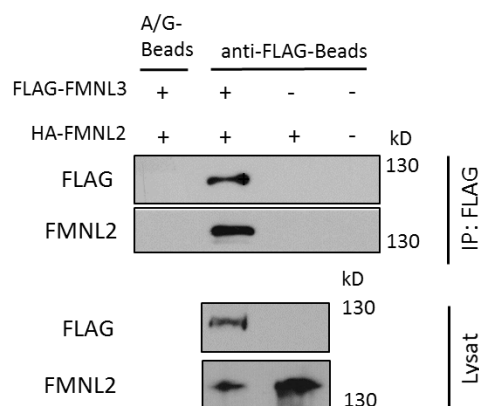
Bisher konnte gezeigt werden, dass die FH2-Domäne und die N-terminalen DD von FMNL2 und FMNL3 Hetero-Oligomere formen können (Vaillant et al. 2008). Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Formine FMNL2 und FMNL3 in voller Länge hetero-oligomere Komplexe bilden.

Da in der bisherigen Studie beide FMNLs in Zellen überexprimiert wurden, sollte nun überprüft werden, ob diese Hetero-Dimerisierung unter weniger artifiziellen Bedingungen ebenfalls auftritt. Um dies in Melanomzellen zu prüfen, wurden Ko-Immunpräzitationen durchgeführt und die präzipitierten Bindungspartner von FMNL2 anschließend massenspektrometrisch untersucht (IP-mass spec). Diese Untersuchung erfolgte durch H. Genau (Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Biochemie II). Hierfür wurden MV3-Wildtypzellen mit einem HA-FMNL2 exprimierenden Plasmid transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für die IP-mass spec aufgearbeitet und letztlich endogene Proteine bestimmt, welche mit FMNL2 interagieren.

Durch diese Analyse konnten zahlreiche als mit hoher Wahrscheinlichkeit mit FMNL2 interagierende Proteine (*high-confident candidate interacting proteins*, HCIPs) identifiziert werden. Als HCIPs zählen Proteine mit einem APSM (*Average Peptide Spectral Match*)  $\geq 3$  und einem WDN-Score (*Weighted and Normalized D-Score*)  $\geq 1$ . Dabei gibt der APSM-Wert die Anzahl der detektierten Peptide an und der WDN-Wert klassifiziert die Güte der Interaktion. Interessanter Weise befanden sich unter den als HCIP klassifizierten Proteinen die *Tight Junction*-Proteine ZO-1 (*Zonula occludens 1*) und ZO-2 (*Zonula occludens 2*), welche für Verbindung des Aktinzytoskeletts mit den *Tight Junctions* von Bedeutung sind, und das an Zell-Matrix-Interaktionen beteiligte Protein Syndecan-1. Weiterhin konnte eine starke Interaktion von HA-FMNL2 und endogenem FMNL3 festgestellt werden (Abb. 31 a).

**a**

Protein	APSM	WDN	Potenzielle Rolle
FMNL2	153	37,11	Zellmotilität
FMNL3	11	9,95	
Syndecan-1	3	3,06	Zellproliferation, -migration, Zell-Matrix-Interaktion
Zonula occludens Protein 1	17	1,04	Verbindung der <i>Tight Junctions</i> mit Aktinzytoskelett
Zonula occludens Protein 2	9	0,76	Verbindung der <i>Tight Junctions</i> mit Aktinzytoskelett

**b****Abb. 31: FMNL2 interagiert mit FMNL3 in MV3-Zellen.**

(a) Auswahl einiger HCIPs (*high-confident candidate interacting proteins*) von FMNL2 in MV3-Zellen. Nach Transfektion der Zellen mit HA-FMNL2 erfolgte die Detektion der damit interagierenden Proteine durch mit Ko-Immunpräzitationen kombinierte massenspektrometrische Untersuchungen (*IP-mass spec*). (b) Ko-Immunpräzitation von überexprimiertem HA-FMNL2 und FLAG-FMNL3. Die IP erfolgte mit anti-FLAG-Beads (Maus) gefolgt von Immunoblotting mit Maus anti-FLAG-Antikörpern (FMNL3) und Kaninchen anti-FMNL2-Antikörpern. Die Kontrollprobe ist durch MV3-Zellen dargestellt, die mit HA-FMNL2 und pLink-Leervektor transfiziert wurden.

Folgend sollte diese Interaktion zwischen FMNL2 und FMNL3 in MV3-Zellen biochemisch durch Ko-Immunpräzitation (Ko-IP) und Western Blot-Analyse bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden MV3-Wildtypzellen ebenfalls mit einem HA-FMNL2 exprimierenden Plasmid transfiziert. Nach Immunpräzitation von FMNL2 konnte jedoch kein daran gebundenes endogenes FMNL3 detektiert werden. Aufgrund des *IP-mass spec*-Ergebnisses wurde angenommen, dass die Anzahl der mit FMNL2 interagierenden FMNL3-Proteine unter der Detektionsgrenze des Western Blots lag.

Aus diesem Grund wurden die MV3-Zellen transient mit HA-markiertem FMNL2 und FLAG-markiertem FMNL3 transfiziert und anschließend Ko-IPs durchgeführt (Abb. 31 b). Dabei wurde FLAG-FMNL3 immunpräzipitiert und bezüglich daran gebundenem FMNL2 durch Western Blot-Analyse untersucht. Hierbei konnte an dem präzipitieren FMNL3 gebundenes FMNL2 detektiert werden, wodurch in MV3-Zellen eine Interaktion bzw. Hetero-Dimerisierung von FMNL2 und FMNL3 gezeigt wurde und die vorangegangene Studie von Vaillant et al. bestätigt werden konnte. Somit legen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung nahe, dass die beiden Formine FMNL2 und FMNL3 in der Lage sind, Hetero-Dimere zu bilden.

### 3.6 Der Einfluss von FMNL1-3 auf den MAL-SRF-Signalweg

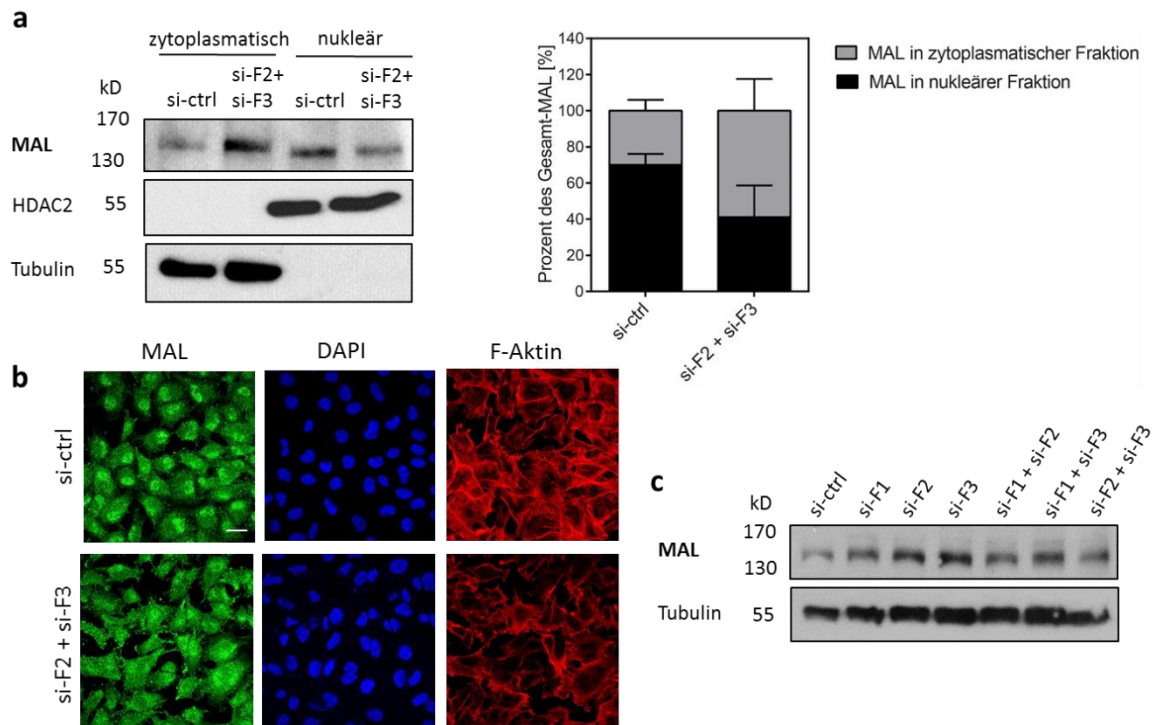
Der MAL-SRF-Signalweg ist nicht nur für die Transkription von Genen des Zytoskeletts von Bedeutung, sondern es wurde gezeigt, dass daueraktives SRF einen Einfluss auf die Proliferation von Leberzellen hat und zusammen mit dessen Kofaktor MAL für die Migration von Zellen wichtig ist (Ohrnberger et al. 2015; Medjkane et al. 2009). Obwohl MAL die Expression proliferationsrelevanter Gene beeinflusst (Shaposhnikov et al. 2013), gibt es dennoch wenig Evidenz für dessen Einfluss auf die Proliferation. Durch ihre Fähigkeit der Aktinpolymerisation üben Formine einen indirekten Einfluss auf den MAL-SRF-Signalweg aus. Da die bisher beobachteten Veränderungen bei FMNL2- und FMNL3-Expressionsverminderung ähnliche Effekte zeigten wie eine Runterregulierung von MAL und SRF, sollte überprüft werden, inwieweit Zusammenhänge zwischen der verminderten FMNL-Expression und dem MAL-SRF-Signalweg bestehen.

#### 3.6.1 Die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 beeinflusst die subzelluläre Verteilung von MAL.

Die subzelluläre MAL-Verteilung ist von der G-Aktin-Konzentration in der Zelle abhängig. Formine tragen durch den Aufbau von Aktinfilamenten zur Reduzierung des monomeren G-Aktins bei, was eine Translokation von MAL in den Nukleus zur Folge hat (Miralles et al. 2003). Aufgrund dieses Zusammenhangs sollte überprüft werden, inwiefern sich die Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 auf die zelluläre Verteilung des SRF-Kofaktors MAL auswirkt.

Da sich bei einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 bisher die stärksten Effekte zeigten, konzentrierten sich die Untersuchungen auf diese Zellen. Hierfür wurden zelluläre Fraktionierungen von MV3-Kontrollzellen (si-ctrl) und MV3-Zellen mit FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung (si-F2 + si-F3) vorgenommen (Abb. 32 a). Mittels Western Blot-Analyse wurde die nukleäre und zytoplasmatische Verteilung von MAL detektiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen diente die Histon-Deacetylase 2 (HDAC2) als Marker für die nukleäre Fraktion und Tubulin als Marker für den zytoplasmatischen Anteil. Bei diesen Analysen wurde deutlich, dass eine Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) zu einer verstärkten Lokalisation von MAL im Zytoplasma führte (Abb. 32 a, rechts). Durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie konnte dieser Effekt bestätigt werden (Abb. 32 b): Es war zu beobachten,

dass MV3-Zellen mit verminderter FMNL2- und FMNL3-Expression (Abb. 32 b, untere Reihe) eine schwächere Konzentration von endogenem MAL im Nukleus aufwiesen als die Kontrollzellen (Abb. 32 b, obere Reihe).



**Abb. 32: Verteilung des endogenen MAL bei kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 in MV3-Zellen**

(a) MAL-Verteilung im Zytoplasma und Nukleus von MV3-Kontrollzellen (si-ctrl) und MV3-Zellen mit runterregulierter FMNL2 und FMNL3-Expression (si-F2 + si-F3). Western Blot-Analyse nach Fraktionierung der Zellen. Dabei wurde die Reinheit der Fraktionen durch HDAC2 (nukleär) und Tubulin (zytoplasmatisch) nachgewiesen. Quantifizierung der prozentualen MAL-Verteilung in der zytoplasmatischen und nukleären Fraktion siRNA-behandelter MV3-Zellen. (n = 3; + SEM). (b) Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen der endogenen MAL-Verteilung in MV3-Kontrollzellen (si-ctrl) und MV3-Zellen mit FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung (si-F2 + si-F3). Die Zellen wurden für MAL (grün, Alexa Fluor 488), F-Aktin (rot, Rhodamin-Phalloidin) und DAPI (blau) gefärbt. (Skala, 20 µm) (c) Western Blot-Analyse der totalen MAL-Expression von Adhäsions-unabhängig gewachsenen MV3-Zellen nach einzelner (si-F1, si-F2, si-F3) und kombinierter (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) FMNL-Runterregulierung.

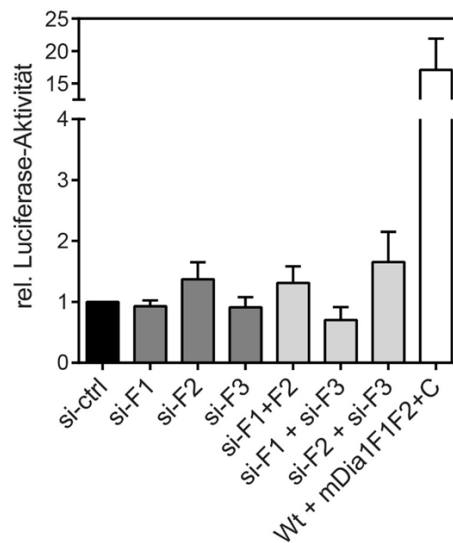
Eine Western Blot-Analyse der Gesamtkonzentration von MAL in Zellen mit einzelnen und kombinierten FMNL1-3-*Knockdowns* zeigte jedoch, dass diese nicht verändert ist (Abb. 32 c). Daher lässt sich sagen, dass die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 zu einem Anstieg der MAL-Konzentration im Zytoplasma führt, jedoch nicht dessen generelle Expression beeinflusst.

### 3.6.2 Die Runterregulierung von FMNL1-3 beeinflusst nicht die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF.

Die durch Formine vermittelte Aktinpolymersiation führt zu einer Anreicherung des SRF-Kofaktors MAL im Nukleus und damit zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität von SRF (Miralles et al. 2003). Folgend sollte überprüft werden, inwiefern sich die veränderte MAL-Verteilung nach siRNA-vermittelter FMNL-Runterregulierung auf die SRF-abhängige Transkription auswirkt. Um diesen Einfluss auf die Aktin-vermittelte Regulierung von SRF zu untersuchen, wurden SRF-Reportergenanalysen mit dem Reporter 3D.AFOS in MV3-Zellen durchgeführt. Nach einer 20-stündigen Starvierung der Zellen wurden diese mit 20 % FCS-haltigem Medium stimuliert und daraufhin die SRF-Aktivität gemessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit einem konstitutiv aktiven Konstrukt des Formins mDia1 (mDia1 F1F2 + C) transfiziert wurden, welches zu einer gesteigerten SRF-Aktivität führte. Es konnte jedoch keine Veränderung der SRF-Aktivität nach FMNL-*Knockdown* gezeigt werden (Abb. 33).

Anhand von Färbungen des endogenen MAL in MV3-Wildtypzellen konnte festgestellt werden, dass es durch Starvierung der Zellen nicht zu einer Abnahme der MAL-Konzentration im Nukleus kam (nicht gezeigt). Eine erfolgreiche Starvierung und die darauf folgende Serumstimulation der Zellen im Rahmen des SRF-Reporterassays sind jedoch für dessen Aussagekraft notwendig. Dies könnte erklären, weshalb eventuell vorhandene Unterschiede in der SRF-Aktivität durch die mangelnde Starvierung der MV3-Zellen maskiert wurden.

Weiterhin wurden qPCR-basierte Expressionsanalysen von MAL-SRF-Zielgenen wie ACTA2, Cofilin, SRF und Vinculin durchgeführt (nicht gezeigt). Obwohl einige Tendenzen zu beobachten waren, sind jedoch aufgrund der starken Varianzen der Daten bisher keine eindeutigen Aussagen möglich.



**Abb. 33: SRF-abhängige Reporteranalyse**

MV3-Zellen mit siRNA-vermittelter einzelner (si-F1, si-F2, si-F3) und kombinierter (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) Runterregulierung von FMNL1-3 wurden mit dem Reporterplasmid pGL3D.AFOS, der Renilla-Luciferase pRL-TK sowie als Positivkontrolle mit mDia1F1F2+C transfiziert. Nach Starvierung der Zellen wurde die Luciferaseaktivität 24 Stunden nach der Transfektion luminometrisch ermittelt. Die Messungen wurden relativ zur Luciferaseaktivität der Kontroll-Zellen (si-ctrl) dargestellt. (n = 5; + SEM).

### 3.6.3 Rettung der durch FMNL-Runterregulierung bedingten Effekte durch konstitutiv aktives MAL

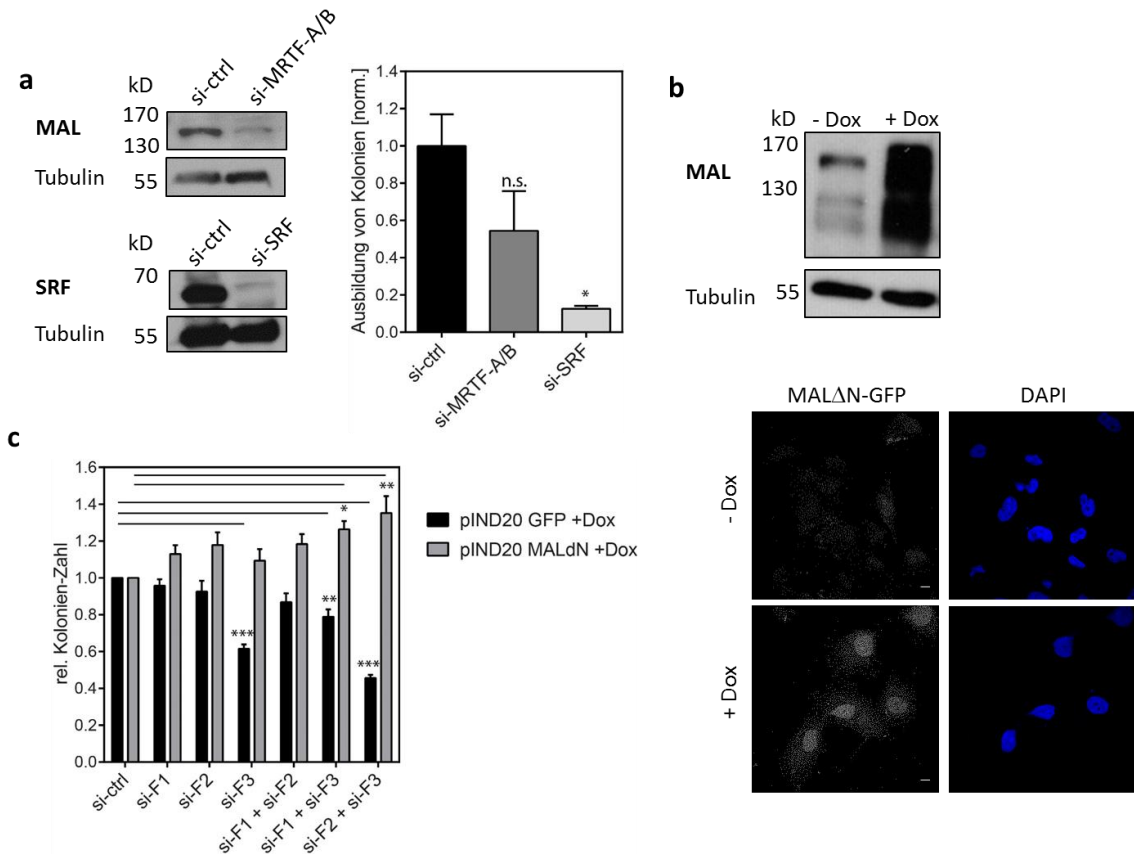
SRF und sein Kofaktor MAL sind jedoch nicht nur für die Expression bestimmter Zielgene von Bedeutung, sondern auch für die Proliferation von Zellen und das Tumorstwachstum (Shaposhnikov et al. 2013; Ohrnberger et al. 2015). Die Expressionsverminderung von MAL und SRF zeigen somit den gleichen Effekt wie eine FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung. Aufgrund dieser Übereinstimmung und der zuvor beobachteten MAL-Verminderung im Nukleus nach FMNL2- und FMNL3-*Knockdown*, sollte getestet werden, ob eine Überexpression von MAL den Phänotyp des FMNL-*Knockdowns* retten kann.

Zu diesem Zweck wurden MV3-Zellen mit siRNA gegen MRTF-A/B sowie SRF behandelt und zunächst deren Ausbildung von Kolonien im Soft-Agar Assay nach MAL- und



SRF-Runterregulierung beurteilt (Abb. 34 a). Übereinstimmend mit den voran gegangenen Studien ließ sich ein reduziertes Wachstum der Zellen im Soft-Agar feststellen. Dabei war der Effekt der siRNA-vermittelten SRF-Runterregulierung mit einer etwa 90%-igen Wachstumsverminderung am stärksten. Anschließend sollte der Effekt von konstitutiv aktivem MAL in Zellen mit FMNL-Runterregulierung beurteilt werden. Hierfür wurden MV3-Zellen mit dem pIND20 MAL $\Delta$ N-GFP-Plasmid transduziert, welches nach Doxycyclin-Induktion zur Expression von konstitutiv aktivem MAL führte. Um die Lokalisation des MAL-Konstrukts beurteilen zu können, wurde es durch GFP markiert. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass die Zugabe von Doxycyclin die Expression von MAL induzierte (Abb. 34 b, oben). Auch durch konfokale Mikroskopie konnte die induzierbare Überexpression des MAL-Konstrukts und dessen nukleäre Lokalisation bestätigt werden (Abb. 34 b, unten).

Nachdem die Funktionalität des Systems erwiesen wurde, sollte der Einfluss der MAL-Überexpression auf das Wachstum der Zellen mit FMNL-Expressionsverminderung im Soft-Agar analysiert werden (Abb. 34 c). Als Kontrolle wurden zusätzlich MV3-Zellen verwendet, die induzierbar GFP-exprimierten (pIND20 GFP). Die Soft-Agar Assays wurden unter regelmäßiger Zugabe von Doxycyclin durchgeführt, wodurch die Zellen kontinuierlich MAL $\Delta$ N-GFP bzw. GFP exprimierten. Die Analyse der Kolonienausbildung im Soft-Agar zeigte, dass in den GFP-exprimierenden Zellen der *Knockdown* von FMNL3 (si-F3) sowie die kombinierten FMNL-*Knockdowns* (si-F1 + si-F2, si-F1 + si-F3, si-F2 + si-F3) zu einem reduzierten Wachstum führten. Dabei war der Effekt einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3), der zu einem um etwa 60 % verringerten Wachstum führte, am stärksten. Diese verminderte Ausbildung von Kolonien in Folge verminderter FMNL-Expression war jedoch bei den MAL-exprimierenden Zellen nicht zu beobachten. Trotz der Runterregulierungen von FMNL1-3 zeigten die MAL $\Delta$ N-exprimierenden Zellen eine etwa gleiche Kolonienausbildung wie die Kontrollzellen (si-ctrl).



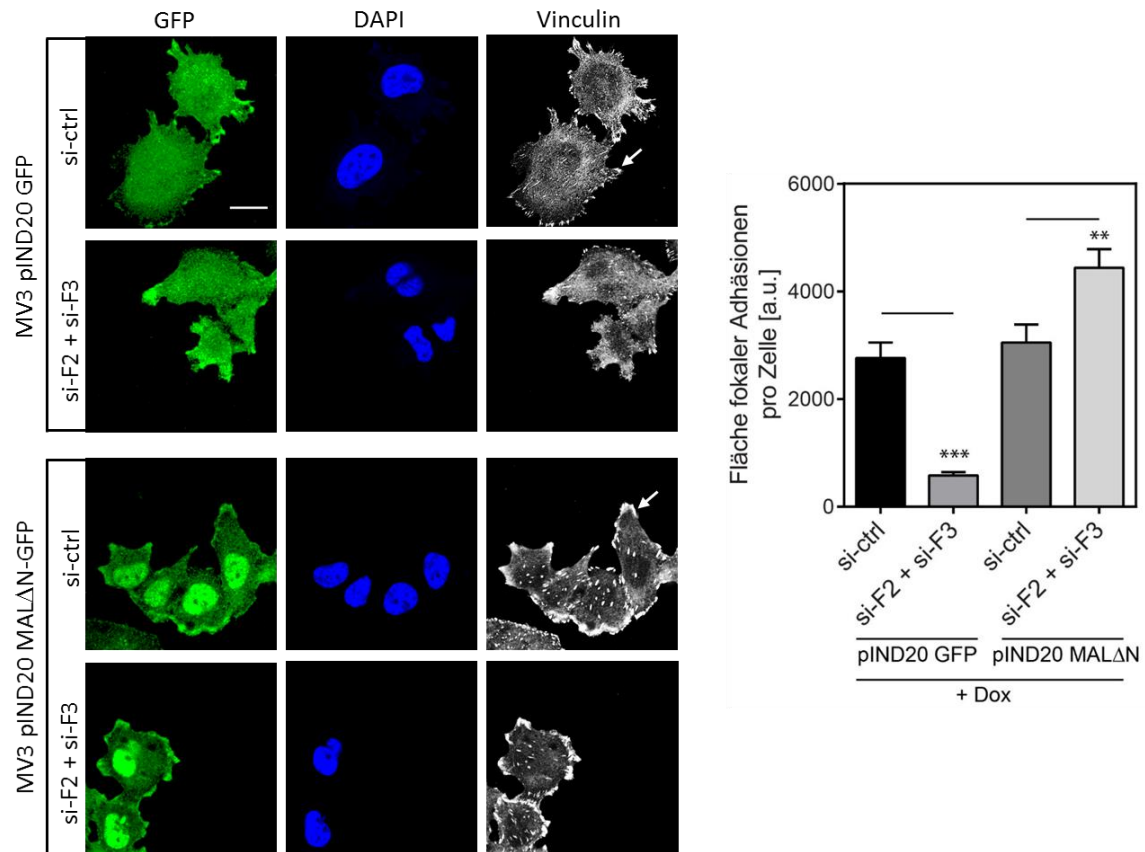
**Abb. 34: Effekt der MAL-Überexpression in MV3-Zellen nach FMNL-Runterregulierung auf die Kolonienausbildung im Soft-Agar**

(a) Western Blot-Analyse der siRNA-vermittelten Runterregulierung von MAL (si-MRFT-A/B) und SRF (si-SRF) in MV3-Zellen. Quantifizierung der Soft-Agar Assays von MV3-Zellen nach siRNA-vermittelter MAL- und SRF-Expressionsverminderung. (n = 3; + SEM). \* p < 0,05; einfaktorielle ANOVA. (b) Nachweis der induzierbaren Überexpression von konstitutiv aktivem MAL in MV3-Zellen mittels Western Blot. Die MV3-Zellen wurden mit einem pInducer20-Plasmid (pIND20 MALΔN-GFP) transduziert, welches nach Zugabe von Doxycyclin (+Dox) zur Überexpression von GFP-markiertem konstitutiv aktivem MAL führte. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Doxycyclin-induzierten Expression von MALΔN-GFP in MV3-Zellen. (Skala, 10 μm) (c) Quantifizierung von Soft-Agar Assays von induzierbar GFP (pIND20 GFP)- und MALΔN-GFP (pIND20 MALΔN)-exprimierenden MV3-Zellen nach siRNA-vermittelter Runterregulierung von FMNL1-3. Die Soft-Agar Assays wurden unter kontinuierlicher Zugabe von Doxycyclin durchgeführt. Die GFP-exprimierenden MV3-Zellen dienten als Kontrolle. (n = 3; + SEM). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; einfaktorielle ANOVA

Folgend sollte analysiert werden, ob der Effekt der kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 auf die Vinculin-Verteilung an FAs auch durch die Überexpression von MAL gerettet werden kann. Hierzu wurden GFP (pIND20 GFP)- und MALΔN

(pIND20 MAL $\Delta$ N-GFP)-exprimierende Zellen mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) und siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) transfiziert und die Expression von GFP und MAL $\Delta$ N durch Doxycyclin-Zugabe induziert. Als Marker für FAs wurde Vinculin in fixierten MV3-Zellen gefärbt und die Fläche fokaler Adhäsionen mit Hilfe von Vinculin-Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt (Abb. 35). Hierbei wurden Bereiche mit positiver Vinculin-Färbung (siehe weiße Pfeile) als FAs definiert. Die Analyse zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die Kolonienausbildung im Soft-Agar: Der Doppel*knockdown* von FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) führte lediglich bei den GFP-exprimierenden Zellen (pIND20 GFP) zu einer signifikanten Reduzierung der FAs im Vergleich zu den Kontrollzellen (si-ctrl), während die MAL $\Delta$ N-exprimierenden Zellen (pIND20 MAL) mit FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung (si-F2 + si-F3) sogar einen Anstieg der FA-Fläche zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FMNL2 und FMNL3 für die Translokalisierung von MAL in den Nukleus von Bedeutung sind. Obwohl kein direkter Zusammenhang gezeigt wurde, konnte belegt werden, dass eine Re-Expression von MAL im Nukleus durch induzierte Überexpression von konstitutiv aktivem MAL den wachstumshemmenden und FA-verkleinernden Effekt der kombinierten Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 aufheben kann.



**Abb. 35: Vinculin-Verteilung an FAs nach MAL-Überexpression und kombinierter Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3**

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen von induzierbar GFP (pIND20 GFP) und MALΔN (pIND20 MALΔN-GFP) exprimierenden MV3-Zellen. Diese wurden jeweils mit Kontroll-siRNA (si-ctrl) und siRNA gegen FMNL2 und FMNL3 (si-F2 + si-F3) behandelt. Die Darstellung von GFP und MALΔN-GFP erfolgte in grün. Weiterhin wurden die Zellen für Vinculin (weiß, Alexa Fluor 555) und DAPI (blau) gefärbt. (Skala, 10  $\mu$ m). Fokale Adhäsionen wurden durch positive Vinculin-Färbung (siehe weiße Pfeile) definiert und die Fläche fokaler Adhäsionen pro Zelle quantifiziert. Pro Kondition wurden > 32 Zellen analysiert. (n = 2; + SEM). \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; t-Test.

## 4. Diskussion

Anhand von Analysen ihrer hoch konservierten, für den Aufbau von Aktinfilamenten verantwortliche FH2-Domäne wurden die 15 in Säugetieren vorkommenden Formine in 7 Gruppen eingeteilt (Pruyne et al. 2002; Goode and Eck 2007). Darunter befindet sich die Gruppe der FMNLs (FMNL1, 2 und 3), welche zu den *Diaphanous related* Forminen (DRFs) gehören. DRFs spielen aufgrund ihrer Fähigkeit, Aktinfilamente aufzubauen eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen. Neben der Regulation der Motilität von Zellen sind sie auch für weitere zelluläre Prozesse wie der Morphogenese, Zelladhäsion, Zellpolarität und Cytokinese von Bedeutung (Baarlink, Brandt, and Grosse 2010). In dieser Arbeit wurde erstmalig neben der Relevanz der Formine FMNL1-3 für die Invasivität von Melanomzellen auch ihr Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit genauer untersucht. Durch die Runterregulierung der drei Formine FMNL1-3 konnte folgendes festgestellt werden: 1. FMNL1 hat weder auf die Invasivität noch auf die Proliferation von Melanomzellen einen Einfluss. 2. FMNL2 wurde hingegen als das treibende FMNL bei der Invasivität identifiziert, was durch vorhergehende Studien unter anderem in CRC-Zelllinien bestätigt wurde (Kitzing et al. 2010; Zhu, Liang, and Ding 2008). 3. FMNL2 und FMNL3 interagieren *in vitro* und können daher Hetero-Dimere bilden. 4. Die Proliferation und der Zellzyklus werden durch FMNL2 und besonders FMNL3 reguliert, indem beide Formine die Integrität von fokalen Adhäsionen beeinflussen. 5. Durch eine therapeutische Behandlung mit kombinierten siRNAs gegen FMNL2 und FMNL3 konnte das Wachstum von Melanomzell-Tumoren in Mausexperimenten vermindert werden, wodurch die beiden Formine als mögliche neue Ziele der Melanom-Therapie identifiziert werden konnten.

### 4.1 FMNL2 reguliert die Invasionsfähigkeit von Melanomzellen.

Anhand von zwei unterschiedlich konzipierten 3D-Invasionsassays mit zwei Melanomzelllinien konnten wir zeigen, dass FMNL2 die Invasivität von Melanomzellen beeinflusst. Dabei führte ausschließlich ein FMNL2-*Knockdown* in Matrigel-Invasionsexperimenten zu einer signifikanten Reduktion der Invasivität (Abb. 14 c). Weitere Analysen der Invasionsfähigkeit mittels Kollagen-Invasionsassays zeigten, dass sowohl die Migrationsgeschwindigkeit, als auch die Gerichtetheit/Direktionalität nach einer FMNL2-

Runterregulierung vermindert waren (Abb. 15 c). Während sich in den Matrigel-Invasionsexperimenten ein signifikanter Effekt der FMNL2-Runterregulierung zeigte, konnte in den Kollagen-Invasionsassays lediglich ein leichter Effekt des FMNL2-*Knockdowns* beobachtet werden. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, dass in diesen Lebendzell-Kollagen-Invasionsexperimenten durch eine Runterregulierung von Forminen teilweise eher moderate Effekte erzielt werden. Weiterhin musste festgestellt werden, dass viele als invasiv charakterisierte Melanomzelllinien in diesem Assay keine Invasivität zeigten.

Übereinstimmend mit unseren Daten aus den Matrigel-Invasionsassays führte eine Runterregulierung von FMNL2 in Kolorektalkarzinom (CRC)-Zelllinien zu einer verminderten Invasivität und Motilität, während die Überexpression den gegenteiligen Effekt zeigte (Zhu et al. 2011; Liang et al. 2013; Lu et al. 2015). Es gelang uns weiterhin durch Mausexperimente mit FMNL2- oder FMNL3-defizienten LOX-Zellen zu bestätigen, dass lediglich eine FMNL2-Runterregulierung die Invasionsfähigkeit der Zellen beeinflusst. Hierfür wurde die Zahl der vom subkutanen Primärtumor disseminierten Tumorzellen unter anderem im Blut gemessen und als Indikator für die Invasionsfähigkeit der Zellen genutzt. In diesem Zusammenhang korrelierte in CRC-Patientenmaterial eine verstärkte FMNL2-Expression mit einem aggressiverem Tumorverhalten, was sich in einer gesteigerten lymphatischen Metastasierung äußerte (Zhu, Liang, and Ding 2008). Wir stellten ebenfalls eine erhöhte FMNL2-Expression in besonders invasiven und metastatischen Melanomzelllinien fest (nicht gezeigte qPCR-Daten, Tabelle 12). Weitergehende Analysen des Zusammenhangs von FMNL2 und der Zellinvasivität zeigten, dass FMNL2 die für eine Erlangung invasiver Eigenschaften notwendige epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) in CRC-Zelllinien positiv beeinflusst (Li et al. 2010). Demnach ist FMNL2 ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps und die daraus resultierende Invasivität. Auch durch das EMT-induzierende TGF $\beta$  konnte nach der Runterregulierung von FMNL2 kein mesenchymaler Phänotyp und folglich auch keine Invasivität der Zellen induziert werden (Li et al. 2010). Dies bestätigt unsere bereits erwähnten Mausexperimente mit den modifizierten LOX-Zellen, in denen die Zahl disseminierter Tumorzellen von FMNL2- oder FMNL3-defizienten subkutanen Tumoren gemessen wurde. In diesen Analysen zeigte lediglich eine FMNL2-Runterregulierung eine tendenziell verminderte Initiierung der Metastasierung (Abb. 22 b). Aufgrund der geringen Menge an Daten darf dies bisher lediglich als Trend angesehen werden.

Im Gegensatz zu FMNL2 ist der Zusammenhang zwischen FMNL3 und der Metastasierung bisher weitestgehend unklar. Kürzlich wurde beschrieben, dass neben FMNL2 auch eine gesteigerte Expression von FMNL3 im CRC mit einem verstärkten Auftreten lymphatischer Metastasen und geringeren Überlebenschancen der Patienten korreliert (Zeng et al. 2015). In diesem Zusammenhang führte eine FMNL3-Runterregulierung in Mausexperimenten zu einem geringeren Wachstum subkutaner Tumore und reduzierter Lebermetastasierung nach der Injektion von Tumorzellen in den Blinddarm (Zeng et al. 2015). Zudem konnte FMNL3 in verschiedenen vorherigen Studien mit der Ausbildung unterschiedlicher Aktin-basierter Zellfortsätze in Zusammenhang gebracht werden, welche für die Zellmotilität von Bedeutung sind. So wurde durch Immunfärbungen einerseits eine Anreicherung von endogenem FMNL2 und FMNL3 in Lamellipodien gezeigt (Block et al. 2012). Andererseits ist es für die Ausbildung der Sensoren der Zellmigration, die Filopodien, verantwortlich (Harris et al. 2010). In verschiedenen Zelltypen konnte durch die Expression von GFP-markiertem FMNL3 die Filopodien-Bildung stimuliert werden und eine Anreicherung des Konstrukts an deren Spitzen detektiert werden (Harris et al. 2010). Diese Stimulation der Filopodien-Ausbildung konnte in Neuroblastom-Zellen bestätigt werden (Lynch et al. 2013). Mit Hilfe von im Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Kollagen-Invasionsexperimenten wurde der Effekt einer FMNL3-Expressionsverminderung auf die Invasionsgeschwindigkeit und Direktionalität in Melanomzellen untersucht. Die bisherigen Studien bestätigend wurde eine tendenzielle Reduktion dieser beiden Invasionsparameter in FMNL3-defizienten Melanomzellen beobachtet (Abb. 15 c). Dieser Effekt war jedoch weniger deutlich ausgeprägt als bei FMNL2-defizienten Zellen und ist daher als Trend anzusehen.

Zuvor wurde im Zusammenhang mit der FMNL3-induzierten Filopodien-Ausbildung und der damit verbundenen gesteigerten Invasivität der Zellen eine verringerte Expression der -unter anderem- gegen FMNL3 gerichteten mikroRNA miR-335 beobachtet (Lynch et al. 2013). Diese ist wiederum ein starker Suppressor der Tumorzellmigration, Invasion und Metastasierung. Auch für FMNL2 konnte nachgewiesen werden, dass die Expression zweier miRs invers mit der Expression von FMNL2 in CRC-Zelllinien korreliert. In daraufhin durchgeführten Mausexperimenten konnte durch die jeweilige Expression dieser miRs die Metastasierung und das Wachstum subkutaner Tumore vermindert werden (Liang et al. 2013; Lu et al. 2015).

Neben der Ausbildung von Zellfortsätzen spielt auch die Adhäsion der Zellen an der EZM durch fokale Adhäsionen und deren geregelter Auf- und Abbau eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration. Nach Wang et al. fördert FMNL2 nach seiner aktivierenden Phosphorylierung durch die Kinase PKC $\alpha$  die Zellmotilität, indem es die Internalisierung des FA-Oberflächenrezeptors ITGB1 vorantreibt (Wang et al. 2015). Im Rahmen dieser Studie wurde zunächst in HeLa-Zellen gezeigt, dass nach Runterregulierung von FMNL2 die ITGB1-Internalisierung reduziert ist und dass FMNL2 nach Aktivierung durch PKC $\alpha$  eine endosomale Lokalisation aufweist. Weiterführende Untersuchungen unter Verwendung einer phospho-mimetischen Form von FMNL2, welche die Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  imitiert, wurde in HeLa-Zellen mit Ko-Immunpräzipitationen eine Interaktion von FMNL2 und dem Integrin-Heterodimer-Bestandteil Integrin  $\alpha$ -5 festgestellt. Somit ist anzunehmen, dass FMNL2 nach seiner aktivierenden Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  zur Internalisierung von Integrin  $\beta$ -1 enthaltenden Integrin-Heterodimeren führt, indem es direkt mit der  $\alpha$ -Untereinheit interagiert. Durch Untersuchungen des Einflusses verschiedener FMNL2-Mutanten auf die Invasivität der Melanomzelllinie A375M2 konnte aber auch gezeigt werden, dass FMNL2 nicht nur durch ITGB1-Internalisierung, sondern auch durch seine zusätzlichen Aktin-vermittelten Funktionen die Zellinvasivität beeinflusst (Wang et al. 2015). Abweichend hiervon beobachte ich jedoch nach einem Doppel*knock-down* von FMNL2 und FMNL3 weniger ITGB1 auf der Zelloberfläche von MV3-Zellen (Abb. 29). Anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen für das FA-Protein Vinculin konnten wir jedoch zeigen, dass eine FMNL3-Runterregulierung die Ausbildung fokaler Adhäsionen stärker vermindert als ein FMNL2-*Knockdown* (Abb. 28 a). Da jedoch in den untersuchten Melanomzelllinien eine FMNL3-Runterregulierung die Invasivität weniger stark beeinflusste als eine FMNL2-Expressionsverminderung, ist zu vermuten, dass in dem von uns untersuchten zellulären System neben fokalen Adhäsionen weitere von FMNL2 abhängige Faktoren die Invasivität beeinflussen. Zudem ermittelten Wang et al. nicht wie wir mittels Durchflusszytometrie die ITGB1-Oberflächenexpression, sondern nutzten HeLa-Zellen für Biotin-IP-basierte Internalisierungsassays. Somit sind unsere Ergebnisse sowohl aufgrund der unterschiedlichen zellulären Systeme, als auch aufgrund der unterschiedlichen Experimente nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar. Obwohl Wang et al. die Internalisierung von ITGB1 gemessen haben, lässt dies nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf dessen Oberflächenexpression zu, da diese nicht nur



durch die Internalisierungsrate, sondern auch durch die Rückführung von ITGB1 an die Zelloberfläche bedingt wird.

Für die FMNL2-geförderte Motilität und Invasivität wurde auf molekularer Ebene gezeigt, dass sie in Abhängigkeit von Cdc42 und RhoC erfolgen (Block et al. 2012; Kitzing et al. 2010). Dabei wurde FMNL2 als erster Cdc42-Effektor identifiziert, der die Zellmigration/-motilität durch Aktinpolymerisation an der Spitze von Lamellipodien reguliert (Block et al. 2012). Des Weiteren fördert FMNL2 nicht nur die EMT und die daraus resultierende mesenchymale Invasion (Li et al. 2010), sondern auch -als spezifischer Effektor von RhoC- die amöboide Invasion von Zellen (Kitzing et al. 2010). In einem siRNA-Screen verschiedener Zelllinien wurde auch der Einfluss von FMNL1 und FMNL3 auf die Invasivität im Matrigel-Invasionsassay untersucht. Während FMNL3 hier keinen Effekt auf die Invasivität der Zellen hatte, konnte durch Runterregulierung von FMNL1 ebenfalls die Invasivität der Zellen reduziert werden, wenn auch schwächer als bei einer FMNL2-Expressionsverminderung (Kitzing et al. 2010). Diesen Effekt von FMNL1 auf die Zellinvasivität konnten wir in unseren Experimenten nicht bestätigen, obwohl das FMNL-Expressionsschema der dort verwendeten Melanomzelllinie MDA-MB-435 dem der von uns verwendeten ähnelt. Diese Melanomzelllinie ist ihrer Nomenklatur zufolge eine Brustkarzinom-Zelllinie und wurde über Jahrzehnte als solche in Experimenten verwendet. Nach genaueren Untersuchungen wurde diese Zelllinie jedoch 2012 als Melanomzelllinie charakterisiert und neu klassifiziert. Daher sollte eine vergleichende Betrachtung der mit dieser Zelllinie gewonnen Ergebnisse und unseren Resultaten nur unter Vorbehalt erfolgen. Dennoch konnten wir übereinstimmend mit Kitzing et al. FMNL2 als Treiber der Invasivität in Melanomzellen identifizieren, wobei auch abhängig vom zellulären System FMNL1 und FMNL3 einen geringeren Einfluss auf die Zellinvasivität zu haben scheinen. Zusätzlich zeigen unsere Daten der Kollagen-Invasionsstudien mit LOX-Zellen, dass FMNL2 nicht nur die amöboide, sondern auch die mesenchymale Invasion reguliert. Daher könnte es Gegenstand weiterer Studien sein, zu untersuchen, ob FMNL2 dabei über die gleiche GTPasen und Kinasen reguliert wird wie es für die amöboide Invasion gezeigt wurde.

Erste Studien weisen bereits darauf hin, dass die Rho-GTPase Rac1, welche über N-Ras aktiviert wird, eine wichtige Rolle für die Metastasierung von Melanomzellen spielt. Etwa ein Fünftel der Melanome tragen eine aktivierende Mutation des Onkogens N-Ras

(Li et al. 2012). Neben seinem aktivierenden Effekt auf den MAPK-Signalweg, der hauptsächlich die Zellproliferation steuert, erhöht Ras auch die Signalübertragung durch die Rho-GTPase Rac1, welche unter anderem die Motilität von Melanomzellen reguliert (Sanz-Moreno et al. 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von mutiertem N-Ras die Ausbildung Aktin-basierter Zellfortsätze invasiver Tumorzellen, sogenannte Invadopodien, steigert (Li et al. 2012). Zudem konnte eine Abhängigkeit der Metastasierung von Rac1 in modifizierten Melanocytenzelllinien nachgewiesen werden, da Rac1-defiziente Zellen trotz einer aktivierenden N-Ras-Mutation eine reduzierte Lymphknotenmetastasierung in Allograft-Mausexperimenten zeigten (Li et al. 2012).

## **4.2 FMNL2 und FMNL3 regulieren die Proliferation von Melanomzellen.**

Neben der Analyse der Invasivität in Abhängigkeit der FMNLs sollte auch ihr Einfluss auf die Proliferation von Melanomzellen untersucht werden. Bisher konnte zwar in einigen Tumorentitäten ihr Einfluss *in vitro* und *in vivo* auf das Zell- und Tumorwachstum nachgewiesen werden, die genauen Mechanismen sind jedoch weitestgehend ungeklärt (Zhu et al. 2011; Zeng et al. 2015; Lu et al. 2015; Liang et al. 2013).

Unsere Daten zeigen, dass besonders FMNL3, aber auch zu einem geringeren Teil FMNL2, eine wichtige Rolle bei dem Adhäsions-unabhängigen Wachstum von Melanomzellen und deren Tumorwachstum spielen. FMNL1 hingegen hatte für die Proliferation von Melanomzellen keine Bedeutung. Bisher wurde FMNL1 hauptsächlich mit dem hämatopoetischen System und dessen malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So ist es beispielsweise im Non-Hodgkins-Lymphom und in der chronisch lymphatischen Leukämie überexprimiert. Daher ist es möglich, in leukämischen Zellen durch eine Runterregulierung von FMNL1 eine Verminderung der Proliferation, sowie eine Reduktion des Tumorwachstums zu bewirken (Favaro et al. 2013).

Das Melanom nimmt aufgrund seines entwicklungsbiologischen Ursprungs eine besondere Position ein, da es sich aus den vom Neuroektoderm abstammenden Melanocyten entwickelt. Aufgrund dieser entwicklungsbiologischen Besonderheit, die das Melanom von anderen, nicht neuronalen Tumorentitäten unterscheidet, sollte der Effekt von FMNL1 auf die Zellproliferation untersucht werden, obwohl es bisher abgesehen vom

hämatopoetischen System keine Hinweise auf eine diesbezügliche Relevanz gab. Weiterhin sollten durch die Untersuchung aller drei FMNLs mögliche funktionelle Unterschiede sowie eventuell auftretende Synergismen analysiert werden. Da wir allerdings im Gegensatz zu FMNL2 und FMNL3 in invasiven Melanomzelllinien jedoch keine gesteigerte, sondern eine verminderte Expression von FMNL1 detektierten (Abb. 13 a), erwarteten wir in unserem zellulären System keinen Effekt einer zusätzlichen FMNL1-Runterregulierung auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum.

Die Fähigkeit, unabhängig von Adhäsion zu wachsen, ist ein wichtiges Merkmal von Tumorzellen. Die Proliferation von Melanomzellen und deren Ursprungszellen – den Melanocyten – ist unter anderem vom MAPK-Signalweg abhängig. Innerhalb dieses Signalwegs sind bei etwa 70 % der Melanomzellen wichtige Kinasen wie B-Raf oder N-Ras mutiert (Grbovic et al. 2006), wodurch der Signalweg konstitutiv aktiviert wird und die Zellen nicht mehr auf externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren und adhärentes Wachstum angewiesen sind. So konnte für die häufig auftretende, aktivierende B-Raf-Mutation V600E gezeigt werden, dass -im Gegensatz zu Melanocyten- in Melanomzellen, die diese Mutation tragen, der MAPK-Signalweg und die durch ihn regulierte Transkription auch Adhäsions-unabhängig stattfindet (Conner, Scott, and Aplin 2003). Aus diesem Grund wäre es für die Therapie des Melanoms von großer Bedeutung, den Melanomzellen die Fähigkeit des Adhäsions-unabhängigen Wachstums wieder zu entziehen.

Wie bereits erwähnt, konnten wir eine FMNL2- und FMNL3-Abhängigkeit des nicht-adhärenen Zellwachstums beweisen. Diese Untersuchungen erfolgten durch Soft-Agar Assays und durch das nicht-adhärente Wachstum der Zellen auf speziell beschichteten Zellkulturplatten. Dabei konnten wir mit Hilfe dieser zwei unterschiedlichen Assays erstmals einen Zusammenhang zwischen FMNL3 und dem Adhäsions-unabhängigen Wachstum zeigen. In unseren Untersuchungen zeigten sowohl LOX- als auch MV3-Zellen nach FMNL2- oder FMNL3-Runterregulierung eine verminderte Kolonienausbildung im Soft-Agar (Abb. 17 b, Abb. 18 c, Abb. 19 c), wobei der Effekt von FMNL3 stärker ausgeprägt war als der von FMNL2 (Abb. 17 b). Die in unseren Untersuchungen verwendeten LOX-Zellen tragen die häufig auftretende aktivierende B-Raf-Mutation V600E, während in den MV3-Zellen N-Ras mutiert ist. Diese Mutationen erklären, warum nur kombinierte, also starke FMNL-Runterregulierungen einen wachstumshemmenden Effekt auf Plastik zeigten (Abb. 17 b). Dennoch ist es erstaunlich, dass durch die Expressionsverminderung von

Aktinnukleatoren das Adhäsions-unabhängige Wachstum trotz einer Aktivierung von Onkogenen wie B-Raf oder N-Ras vermindert werden kann.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte auch in CRC-Zelllinien durch eine Runterregulierung von FMNL2 die Ausbildung von Kolonien reduziert werden (Zhu et al. 2011; Liang et al. 2013). Weiterhin konnten wir ein vermindertes Wachstum der FMNL2- oder FMNL3-defizienten Zellen auf speziell beschichteten Zellkulturplatten, die eine Adhäsion der Zellen verhindern, feststellen (Abb. 20, Abb. 25 a). In Studien mit CRC-Zellen konnte durch eine Runterregulierung von FMNL2 auch das adhärenente Wachstum von Zellen verringert werden (Zhu et al. 2011; Liang et al. 2013). Daneben verminderte die ektopische Expression der miR-34a, welche die FMNL2-Expression reduziert, die adhärenente Proliferation der Zellen (Liang et al. 2013). In unseren Studien konnte dahingegen kein Einfluss auf das adhärenente Wachstum in Folge eines einzelnen FMNL2- oder FMNL3-*Knockdowns* festgestellt werden (Abb. 18 b, Abb. 19 b). Interessanterweise wurde jedoch durch eine kombinierte Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 das adhärenente Wachstum der Zellen signifikant beeinträchtigt (Abb. 17 a). Es ist zu vermuten, dass für eine Hemmung des adhärenenten Wachstum eine stringendere Behandlung der Zellen durch eine kombinierte Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 nötig ist, da die Zellen aufgrund der Adhäsion genügend Proliferationssingle generiert werden.

Des Weiteren konnten wir durch die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 auch in Mausexperimenten einen deutlichen Effekt auf die Ausbildung und das Wachstum von subkutanen Tumoren erzielen. So war die Ausbildung von Tumoren aus Melanomzellen durch eine verminderte FMNL2- oder FMNL3-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen um 50 % reduziert (Abb. 22 a). In diesem Zusammenhang wurde zuvor gezeigt, dass die bereits erwähnten miRs gegen FMNL2 nicht nur die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro* vermindern, sondern auch zu einem reduzierten Tumorstadium führen (Liang et al. 2013; Lu et al. 2015). Dies bestätigend beobachteten auch Zhu et al. ein vermindertes Wachstum subkutaner CRC-Tumore nach einer FMNL2-Runterregulierung (Zhu et al. 2011). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch eine FMNL3-Expressionsverminderung zu einem verminderten Wachstum subkutaner CRC-Tumore führt (Zeng et al. 2015).

Ferner gelang es uns erstmals, die therapeutische Eignung einer siRNA-Behandlung gegen FMNL2 und FMNL3 im Melanom zu zeigen. So wurde in einer (therapeutischen)

Mausstudie durch eine systemische Behandlung mit PEI/siRNA-Komplexen gegen FMNL2 und FMNL3 das Wachstum etablierter Tumore signifikant reduziert (Abb. 23 a). In vielen Untersuchungen erfolgt die Injektion von siRNA-Komplexen direkt in den Tumor, was für eine potenzielle Therapie einen relativ artifiziellen Behandlungsansatz darstellt. Die von uns durchgeführte systemische Behandlung mit PEI/siRNA-Komplexen stellt dahingegen ein komplizierteres Behandlungsschema dar, da es eine spezifische Freisetzung der siRNAs am Bestimmungsort erfordert. Durch das dabei verwendete niedermolekulare PEI F25-LMW (Werth et al. 2006) werden die siRNAs effizient vor Degradation durch im Serum befindliche Nukleasen geschützt. Am Zielort vermitteln die polymeren PEI-Komplexe schließlich ihre zelluläre Aufnahme sowie die intrazelluläre Freisetzung der siRNAs. Die Funktionalität und Effizienz einer systemischen Verwendung dieser Komplexe wurde bereits mehrfach *in vivo* gezeigt (Höbel et al. 2010; Ibrahim et al. 2011). Auch wenn lediglich eine moderate Wachstumshemmung der Tumore erzielt werden konnte, lässt dieses Ergebnis dennoch eine Diskussion über FMNL2 und FMNL3 als neuartige pharmakologische Ziele in der Melanom-Therapie zu. Es scheint, als müsste für einen deutlichen anti-proliferativen Effekt eine kritische Schwelle von Aktinnukleatoren unterschritten werden. So könnte ein Ansatz für eine Melanom-Therapie auf der gezielten Hemmung der FH2-Domäne aller DRFs beruhen, wie beispielsweise durch den Formin-Inhibitor SMIFH2 (*Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 Domains*) (Rizvi et al. 2009), um das Tumorstadium möglicherweise komplett zu hemmen.

Das Wachstum von Zellen wird durch zahlreiche, sie umgebende Faktoren beeinflusst, von denen lösliche Wachstumsfaktoren und die Integrin-vermittelte Adhäsion an der EZM die wichtigsten darstellen (Schwartz and Assoian 2001). Da ersteres in unseren Experimenten nicht variierte, analysierten wir die Ausprägung fokaler Adhäsionen der FMNL-defizienten Melanomzellen. Als Parameter dafür wurden der FA-Rezeptor Integrin  $\beta$ -1 und das FA-Protein Vinculin genutzt. Dabei wurde die FA-Fläche pro Zelle mittels Immunfluoreszenz-Färbung von Vinculin gemessen und mit Hilfe durchflusszytometrischer Messung die ITGB1-Oberflächenexpression ermittelt. In beiden Analysen stellten wir eine Reduktion der FAs nach FMNL2- und FMNL3-*Knockdown* fest, wodurch uns erstmals die Identifikation einer zellulären Struktur gelang, die für das verminderte Zellwachstum nach FMNL-Expressionsverminderung verantwortlich sein könnte.

Durch die Bestimmung der Fläche fokaler Adhäsionen mittels Immunfluoreszenz-Färbungen von Vinculin stellten wir fest, dass die Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 zu einer Verringerung fokaler Adhäsionen führte (Abb. 28 a). Am stärksten war dieser Phänotyp bei kombinierter Expressionsverminderung von FMNL2 und FMNL3 ausgeprägt. Die FA-Fläche dieser Zellen war im Vergleich zu den Kontrollzellen auf ein Drittel reduziert. Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass die Formine mDia1 und mDia2 für den Auf- und Abbau FAs in migrierenden Zellen verantwortlich sind (Yamana et al. 2006; Gupton et al. 2007). Demnach reguliert der Rho/mDia1-Signalweg den Umsatz fokaler Adhäsionen, indem es für die Anordnung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten sowie das Zuführen bestimmter Proteine wie Src an ihre Bestimmungsorte verantwortlich ist (Yamana et al. 2006). Auch das Formin mDia2 ist aufgrund seiner Regulation der Aktinfilament-Assemblierung an FAs für deren Auf- und Abbau nötig (Gupton et al. 2007).

Integrine stellen einen sehr wichtigen extrazellulären Bestandteil fokaler Adhäsionen dar, der durch die Interaktion mit der EZM das Übersetzen extrazellulärer Signale in intrazelluläre initiiert (Schwartz and Assoian 2001). Mit Hilfe durchflusszytometrischer Messungen konnten wir feststellen, dass eine kombinierte FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung die Expression von ITGB1 an der Zelloberfläche signifikant reduziert (Abb. 29). Somit konnten wir unser vorheriges Ergebnis bestätigen, dass FMNL2 und FMNL3 für die Integrität fokaler Adhäsionen von Bedeutung sind. In einer vorhergehenden Studie wurde jedoch gezeigt, dass eine Runterregulierung von FMNL2 eine verminderte Internalisierung von ITGB1 in HeLa-Zellen bewirkt (Wang et al. 2015). Wie bereits erwähnt, lässt eine verminderte ITGB1-Internalisierung nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf dessen Oberflächenexpression zu, da diese sowohl durch die ITGB1-Internalisierungsrate, als auch durch dessen Rückführung an die Zelloberfläche bedingt wird. Zudem führten wir unsere Messungen der ITGB1-Oberflächenexpression nach einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 -und nicht wie Wang et al. lediglich nach einer FMNL2-Expressionsverminderung- durch. Anhand der bereits beschriebenen Messungen der FA-Fläche mittels Vinculin konnten wir beobachten, dass eine Runterregulierung von FMNL2 lediglich zu einer leichten Verringerung der FAs führte, während ein FMNL3-*Knockdown* diese signifikant reduzierte. Da unsere durchflusszytometrischen Messungen der ITGB1-Oberflächenexpression nach einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 durchgeführt wurden, ist zu vermuten,

dass hauptsächlich der FMNL3-*Knockdown* für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist.

Für Melanomzellen ist bekannt, dass eine veränderte Interaktion von Integrinen mit der EZM häufig weitreichende, dramatische Folgen hat (Kuphal, Bauer, and Bosserhoff 2005). In diesem Zusammenhang zeigen Zellen während der malignen Transformation häufig eine veränderte Integrin-Expression. So geht eine Integrin-Hochregulierung in Melanomzellen häufig mit der Ausprägung eines stärkeren metastatischen Phänotyps und einem verstärkten Wachstum subkutaner Tumore einher (Marshall et al. 1998). Zudem wurde eine Eignung von ITGB1 sogar als prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben (*disease free survival*, DSF) von Melanom-Patienten festgestellt. Demnach hatten Patienten, deren Melanomzellen eine besonders starke ITGB1-Expression aufwiesen, nach einer Chemotherapie ein wesentlich kürzeres DSF als Patienten, deren Melanomzellen ITGB1 weniger stark exprimierten (Nikkola et al. 2004). Zudem wurde in den auch von uns verwendeten MV3-Melanomzellen gezeigt, dass die Migration von Zellen und die damit verbundene Matrixreorganisation von ITGB1 abhängt (Friedl et al. 1998).

Neben seiner Wichtigkeit für fokale Adhäsionen konnte vor kurzem gezeigt werden, dass FMNL2 in Epithelzellen auch ein wichtiger Regulator von Zell-Zell-Kontakten, sogenannten *Adherens Junctions*, ist (Grikscheit et al. 2015). Dabei wird durch Rac1 aktiviertes FMNL2 für die Aktinassemblierung und den Aktinumsatz an neu geformten Zell-Zell-Kontakten benötigt. Wir konnten mit Hilfe von IP-*mass spec*-Analysen erstmalig feststellen, dass FMNL2 zudem mit *Tight Junction*-Proteinen wie ZO-1 (*Zonula occludens-1*), das ebenfalls für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wichtig ist, interagiert. ZO-1 konnte bereits eine Rolle bei der Stabilisierung von N-Cadherin-basierten Zell-Zell-Kontakten zwischen Melanomzellen nachgewiesen werden (Smalley et al. 2005). Während der malignen Transformation entgehen Melanomzellen der Kontrolle durch Keratinozyten, indem sie ihre E-Cadherin-Expression vermindern. In diesem Zusammenhang konnten auch wir in Western Blot Analysen verschiedener Melanomzelllinien keine E-Cadherin-Expression feststellen. Dahingegen verstärken Melanomzellen ihre N-Cadherin-Expression, wodurch ihre Kommunikation untereinander und mit den sie umgebenden Fibroblasten auf N-Cadherin-basierten Zell-Zell-Kontakten (*Adherens Junctions*) beruht (Haass, Smalley, and Herlyn 2004). Die EMT, ein für die Metastasierung essentieller Prozess, ist durch einen derartigen Wechsel der Cadherin-Expression gekennzeichnet. Im

Gegensatz zu anderen Tumorentitäten ist in Melanomzellen eine Heraufregulierung des an *Tight* und *Adherens Junctions* lokalisierten Proteins ZO-1 zu beobachten, welches mit N-Cadherin kolokalisiert ist (Smalley et al. 2005). Eine Runterregulierung von ZO-1 zeigte dementsprechend eine Schwächung der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Melanomzellen, sowie einen weniger adhären und adhäsiven Phänotyp der Zellen (Smalley et al. 2005). Zudem zeigten ZO-1-defiziente WM35-Melanomzellen eine signifikant reduzierte Invasion aus Zellsphäroiden in die sie umgebende Kollagenmatrix. Die Beziehung von ZO-1 und Forminen ist bislang nicht bekannt und könnte daher in folgenden Experimenten weiter untersucht werden.

Zudem konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass neben FMNL2 auch FMNL3 eine wichtige Rolle für Zell-Zell-Kontakte spielt. Diesbezüglich konnte in Zebrafischembryos durch die Expression von GFP-markierten FMNL3-Konstrukten gezeigt werden, dass FMNL3 an den *Junctions* von Endothelzellen lokalisiert ist und diese durch einen gleich bleibenden F-Aktin-Anteil stabilisiert. Dadurch ist FMNL3 für die Stabilität und Ausbildung der Blutgefäß-Lumen von Bedeutung (Phng et al. 2015). Durch ihren Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte beeinflussen FMNL2 und FMNL3 somit auch die Integrität von Geweben, da diese Kontakte die Zellpolarität, Stabilität und Zell-Kommunikation vermitteln.

Integrin- und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalwege steuern zusammen den Zellzyklus, indem sie Cycline der G<sub>1</sub>-Phase und ihre zugehörigen Kinasen (CDKs) regulieren (Schwartz and Assoian 2001). Wir konnten nach Runterregulierung von FMNL2 oder FMNL3 Veränderungen des Zellzyklus feststellen, was vermutlich eine Folge der verminderten FA-Ausbildung ist. Dabei war der Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase gestört, was zu einer gesteigerten Anzahl von Zellen in G<sub>1</sub> führte (Abb. 26). Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der miR-34a, welche gegen FMNL2 gerichtet ist, in adhären gewachsenen CRC-Zellen ebenfalls den Zellzyklus beeinflusste, indem es zu einer Anreicherung der Zellen in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase führte (Lu et al. 2015). Zusätzlich wurde eine erhöhte Apoptose der Zellen beobachtet, was wir wiederum nicht bestätigen konnten. Auch für das Formin mDia1 wurde bereits eine Verbindung zum Zellzyklus gezeigt (Mammoto et al. 2004). Obwohl mDia1 für einen RhoA-stimulierten Übergang von G<sub>1</sub> in die S-Phase nötig ist, ist es jedoch allein nicht ausreichend für das Fortschreiten der G<sub>1</sub>-Phase. Mammoto et al. zufolge führt mDia1-Aktivierung zu einem Abbau des CDK-



Inhibitors p27, wodurch die Zellen aus ihrem G<sub>1</sub>-Arrest befreit werden und das Fortschreiten des Zellzyklus ermöglicht wird. Dieses Ergebnis unterstützend konnte gezeigt werden, dass eine Runterregulierung von Mitf, welches die Expression von Dia1 reguliert, zu einem Arrest in G<sub>1</sub> führt (Carreira et al. 2006). Während in dieser Studie eine Mitf-Runterregulierung jedoch nicht die Expression von Cyclin D beeinflusste, konnten wir durch die kombinierte Runterregulierung von FMNL1-3 eine Abnahme von Cyclin D1 und CDK4 bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum beobachten (Abb. 26).

Da die Kinase CDK4 Heterodimere mit D-Cyclinen formt und den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus fördert, könnte deren Expressionsverminderung den beobachteten G<sub>1</sub>-Arrest erklären. Frühere Studien zeigten, dass in einigen Zelllinien die Expression von Cyclin D1 komplett Adhäsions-abhängig erfolgt (Zhu et al. 1996). Dementsprechend können durch eine verminderte Cyclin D1-Expression bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum weniger Cyclin D1/CDK4-Komplexe gebildet werden, was zu einem Zellzyklusarrest in G<sub>1</sub> führt. Die von uns verwendeten Kontrollzellen zeigten jedoch bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum in Suspension einen normalen Zellzyklus, der jedoch durch eine verminderte Cyclin D1- und CDK4-Expression nach einer kombinierten FMNL-Runterregulierung gestört wurde.

Da eine Fehlregulierung der CDKs zu einer unkontrollierten Zellproliferation führt, spielen sie, und besonders CDK4, eine zentrale Rolle bei der Tumorigenese (Sheppard and Mcarthur 2013). Bei über 90 % der Fälle liegt im Melanom eine aktivierende genomische Veränderung des CDK4-Signalweges durch beispielsweise Mutationen oder Amplifikationen des CDK4- oder Cyclin D1-Gens vor. Eine derartige Aktivierung des CDK4-Signalweges und die häufig vorkommenden B-Raf- oder N-Ras-Mutationen begünstigen zusammen sehr stark die malignen Transformation von Melanocyten (Sheppard and Mcarthur 2013). Aufgrund der häufigen Aktivierung des CDK4-Signalwegs im Melanom ist CDK4 besonders als potenzielles pharmakologisches Ziel der Melanom-Therapie geeignet. Derzeit befinden sich selektive CDK4-Inhibitoren wie *Palbociclib* in klinischen Studien, in denen sie bisher klinischen Nutzen und eine gute Verträglichkeit zeigten.

In unseren Studien konnten wir erstmals zeigen, dass dieser wichtige Faktor für das Wachstum von Melanomzellen durch FMNL2 und FMNL3 reguliert wird.

Da Formine durch den Aufbau von Aktinfilamenten zur Verminderung der G-Aktin-Konzentration im Zytoplasma beitragen, beeinflussen sie die Lokalisierung des SRF-

Kofaktors MAL (MRFT-A) und somit den MAL/SRF-Signalweg (Sotiropoulos et al. 1999; Miralles et al. 2003). In diesem Zusammenhang wurde bereits für Formine wie mDia1 beschrieben, dass sie aufgrund ihrer Aktin-Polymerisierungsfähigkeit die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF beeinflussen (Geneste, Copeland, and Treisman 2002). Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die Formine FMNL2 und FMNL3 zusammen für die Lokalisation von MAL bedeutend sind. Dabei führte eine Expressionsverminderung beider FMNLs zu einer Anreicherung von MAL im Zytoplasma und folglich zu dessen Reduktion im Nukleus (Abb. 32 a).

Interessanterweise konnten wir weiterhin feststellen, dass die Expression von konstitutiv aktivem MAL das bereits beschriebene Defizit des Adhäsions-unabhängigen Wachstums nach FMNL-*Knockdown* rettete (Abb. 34 c). In einer vorangegangenen Studie wurde eine verminderte Proliferation der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 nach der Runterregulierung von MRTF-A und -B auf Plastik beschrieben (Shaposhnikov et al. 2013). Diese Wachstumsverminderung wurde auf einen verlangsamten Zellzyklus zurückgeführt. Dabei wurde nach Serum-Starvierung eine Abnahme der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus beobachtet. Wir sahen hingegen bei der Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 bei normaler Serumkonzentration auch ohne einen induzierten G<sub>2</sub>/M-Block durch Nocodazol eine tendenzielle Zunahme der Zellen in G<sub>1</sub>, was vermutlich auf eine Abnahme des Integrin-Signalweges zurückzuführen ist. Dahingegen ist der Einfluss des MAL-SRF-Signalweges auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum von Tumorzellen weitestgehend unklar. Wir konnten diesbezüglich erstmals zeigen, dass eine Runterregulierung von MRTF-A/B oder SRF in Melanomzellen zu einer reduzierten Kolonienausbildung im Soft Agar führte (Abb. 34 a).

Zudem wurde dem Transkriptionsfaktor SRF, der unter anderem durch MAL aktiviert wird, kürzlich eine karzinogene Rolle zugeschrieben. So führte die Expression von konstitutiv aktivem SRF in der Leber von Mäusen zu einer Ausbildung von Leberknötchen, die sich schließlich zu einem hepatozellulären Karzinom entwickelten (Ohrnberger et al. 2015). Die Studien, welche MAL und SRF mit der Zellproliferation in Zusammenhang bringen (Shaposhnikov et al. 2013; Ohrnberger et al. 2015), konnten wir insofern bestätigen, als dass wir in Soft-Agar Assays nach einer MRTF-A/B- oder SRF-Runterregulierung eine deutlich reduzierte Kolonienausbildung der Zellen beobachteten (Abb. 34 a). Dass der Einfluss des MAL/SRF-Signalwegs auf die Proliferation von Tumorzellen bisher noch nicht eindeutig geklärt ist, zeigen Medjkane et al.. Im Gegensatz

zu den eben angeführten Studien (Shaposhnikov et al. 2013; Ohrnberger et al. 2015), konnten sie hingegen keinen Einfluss von MAL und SRF auf Proliferation *in vivo* und *in vitro* feststellen (Medjkane et al. 2009). Allerdings reduzierte ein MAL- oder SRF-*Knockdown* die Adhäsion, die Ausbreitung und die Invasivität von Zellen. Gleiches wurde in embryonalen Stammzellen, die kein SRF exprimierten, beobachtet und schließlich auf die fehlende Fähigkeit zur Ausbildung fokaler Adhäsionen zurückgeführt (Schratt et al. 2002). Auch wir untersuchten die Ausprägung der für die Adhäsion der Zellen wichtigen fokalen Adhäsionen. Dabei stellten wir fest, dass durch die Expression des konstitutiv aktiven MAL bei gleichzeitiger Runterregulierung von FMNL1-3 die zuvor beschriebene signifikante Abnahme der fokalen Adhäsionen ausblieb (Abb. 35). Dies führte uns zu der Annahme, dass in der Tat die mangelnde Ausprägung fokaler Adhäsionen bei Runterregulierung von FMNL2 und/oder FMNL3 zu einem verminderten Wachstum der Zellen führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir erstmals einige der zellulären Ursachen des bereits in anderen Studien beobachteten verminderten Zellwachstums nach Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 identifizieren konnten. Aus unseren Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass eine verminderte Expression von FMNL2 oder besonders FMNL3 die Integrität von fokalen Adhäsionen reduziert, was bei Adhäsions-unabhängigem Wachstum zu einem gestörten Ablauf des Zellzyklus führt und somit das für Melanomzellen wichtige Adhäsions-unabhängige Wachstum beeinträchtigt. Um diesen Zusammenhang genauer zu charakterisieren, wäre eine weiterführende Analyse der betroffenen FA-Signalwege interessant, die in einem gestörten Zellzyklus resultieren.

### **4.3 FMNL2 und FMNL3 bilden Hetero-Dimere in Melanomzellen.**

Formine der DRF-Familie enthalten unterschiedliche Domänen, die für ihre Regulierung, aber auch ihre Interaktion untereinander von Bedeutung sind. Im autoinhibierten Zustand interagieren die N-terminale DID mit der C-terminalen DAD der DRFs. Bisherigen Modellen zufolge erfolgt nach ihrer Aktivierung durch Rho-GTPasen eine Dimerisierung der Formine durch die DD (Dimerisierungsdomäne) und die Ausbildung einer Donut-Form durch ihre FH2-Domänen, welche schließlich die Aktinfilamente aufbauen (Pruyne et al. 2002).

Aufgrund seiner zwei für die Dimerisierung wichtigen Domänen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Autoinhibition von mDia1 nicht nur monomer, sondern auch innerhalb eines mDia1-Homodimers erfolgen könnte (Kovar 2006). Durch SRF-Reporteranalysen und Ko-Immunpräzipitationen konnte festgestellt werden, dass mDia1 sowohl homo-dimerisieren, als auch mit mDia2 Hetero-Dimere ausbilden kann (Copeland et al. 2007). Dabei erfolgt die Homo-Dimerisierung von aktiviertem mDia, welche für die Assemblierung von Aktinfilamenten nötig ist, über die DD (Copeland, Copeland, and Treisman 2004). Durch die DID- und DAD-Interaktion von Hetero-Dimeren aus mDia1 und mDia2 führt hingegen zu einer Kreuz-Inhibition der beiden Formine (Copeland et al. 2007).

Die mechanistische Relevanz einer Hetero-Dimerisierung von Forminen ist bisher jedoch kaum bekannt. In unseren Studien beobachteten wir stets einen stärkeren Effekt bei einer kombinierten Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 im Vergleich zu einer einzelnen Expressionsverminderung. Davon ausgehend stellten wir die Hypothese auf, dass diese beiden Formine in ihrer aktiven Form zu einem gewissen Grad zur Hetero-Dimerisierung fähig sein könnten. Auch die 70%-ige Aminosäuresequenzhomologie von FMNL2 und FMNL3 –aber nicht zu FMNL1- unterstützt diese Hypothese (Katoh and Katoh 2003). Zudem wurde durch Analysen der FH2-Domänen nachgewiesen, dass zwischen FMNL2 und FMNL3 eine größere Verwandtschaft besteht als zu FMNL1 (Higgs and Peterson 2005).

In Bezug auf eine gegenseitige Autoinhibition wurde bereits gezeigt, dass es zu einer Hetero-Oligomerisierung der C- und N-Termini von FMNL2 und FMNL3 kommt (Vaillant et al. 2008). Dabei führte jedoch die Expression des N-Terminus von FMNL2 ebenso wenig zu einer Inhibition von FMNL3, wie die Expression des FMNL3-N-Terminus. Dahingegen wurde FMNL2 durch die Expression des FMNL3-N-Terminus inhibiert, was die These bestärkt, dass FMNL3 nicht autoinhibiert ist. Dies lässt vermuten, dass eine mögliche Dimerisierung der beiden FMNLs weniger einer gegenseitigen Inhibition, als der gemeinsamen Aktin-Polymerisierung dienen und FMNL3 dabei womöglich der dominantere Partner sein könnte. Vaillant et al. konnten weiterhin durch Ko-Immunpräzipitations-Experimente nachweisen, dass überexprimiertes FMNL2 und FMNL3 Hetero-Oligomere bilden (Vaillant et al. 2008). In diesem Zusammenhang konnten wir erstmals mit Hilfe von IP-*mass spec*-Untersuchungen zeigen, dass auch endogenes FMNL3 mit überexprimiertem FMNL2 interagiert (Abb. 32 a). Weiterhin konnten wir in

unserem Melanomzellen mittels Ko-IPs bestätigen, dass überexprimiertes FMNL2 und FMNL3 Hetero-Dimere bilden (Abb. 32 b). Eine Ko-Immunpräzipitations-Analyse der Interaktion der beiden endogen exprimierten Formine, sowie nach ausschließlicher FMNL2-Überexpression war jedoch nicht möglich. Aufgrund der IP-*mass spec*-Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass die Interaktion von FMNL2 und FMNL3 unter der Detektionsgrenze lag. Weiterhin wäre es möglich, dass die endogenen Proteine in der Zelle durch verschiedenes *trafficking* unterschiedlich lokalisiert und reguliert werden, wodurch es nur zu einem geringen Teil zu einer Kolokalisation kommen kann. Bisher wurden in unserer Arbeitsgruppe mehrere zum Teil publizierte Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung des endogenen FMNL2 getestet. Allerdings lieferte keiner der Antikörper ein zuverlässiges und zufriedenstellendes Ergebnis, sodass bisher keine Kolokalisationsstudien mittels konfokaler Mikroskopie möglich waren.

Dennoch bestärken diese ersten Resultate unsere Hypothese, dass eine kombinierte Runterregulierung von FMNL2 und FMNL3 die stärksten Effekte auf die Proliferation, die Ausprägung fokaler Adhäsionen und den Zellzyklus erzielt, da die beiden Formine Hetero-Dimere bilden können, welche auch eine gewisse funktionelle Relevanz haben.

Um diese These fortführend zu bestätigen bedarf es allerdings weiterer Untersuchungen. So könnte beispielsweise zunächst die zelluläre Lokalisation von Fluoreszenz-markiertem FMNL2 und FMNL3 betrachtet werden, um eine eventuelle Kolokalisation beider FMNLs festzustellen. Anschließend könnte dies auf endogenem Level versucht werden, wobei aufgrund der bisherigen Ergebnisse zu vermuten ist, dass lediglich ein geringer Teil des endogenen FMNL2 und FMNL3 in Hetero-Dimeren vorliegt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten einige neue und interessante Aspekte bezüglich FMNL2 und FMNL3 und ihres Einflusses auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum sowie mögliche zugrunde liegende Mechanismen gewonnen werden. Weiterhin konnten wir auch eine Abhängigkeit der Melanom-Proliferation vom MAL/SRF-Signalweg und dessen Regulierung durch kombinierte FMNL2- und FMNL3-Expressionsverminderung zeigen.

Eine weiterführende, genauere Analyse dieser Zusammenhänge könnte Aufschluss auf die genauen Mechanismen geben. So sollten weitere Untersuchungen zu der mittels IP-*mass spec* erstmalig identifizierten Interaktion von FMNL2 und dem für Zell-Zell-Kon-

takte wichtigen Protein ZO-1 erfolgen. In diesem Rahmen könnten Ko-IPs oder Kollisionsstudien mit fluoreszenzmarkierten Proteinen erfolgen. Natürlich sollten derartige Analysen auch für FMNL3 erfolgen. Allerdings ist es für diese Untersuchungen, wie auch für die weiterführende Analyse der Hetero-Dimerisierung von FMNL2 und FMNL3 nötig, zuverlässige Antikörper für die endogene Färbung dieser beiden Formine zu finden.

Weiterhin könnte durch weitere Experimente eine Identifizierung der Signalwege erfolgen, durch die ein FMNL2- oder FMNL3-*Knockdown* die Ausbildung von fokalen Adhäsionen beeinträchtigt. Dabei sollte geklärt werden, ob die beiden Formine lediglich durch eine Aktin-vermittelte Stabilisierung zur FA-Integrität beitragen oder ob dies durch andere Mechanismen vermittelt wird. Zudem könnte zukünftig eine Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen der verminderten FA-Ausprägung und der Beeinträchtigung des Zellzyklus nach einer FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung erfolgen. Obwohl durch erste Western Blot-Analysen kein Effekt auf die Phosphorylierung der für die FA-Signalgebung wichtigen FAK detektiert werden konnte, sollte dies nochmals genauer betrachtet werden. So konnte beispielsweise mit Hilfe der durchgeführten IP-*mass spec* das Aurora Kinase A interagierende Protein (AIP) als ein mit FMNL2 interagierendes Protein identifiziert werden. Aurora Kinase A ist ein für das Fortschreiten der Mitose sehr wichtiges Protein (Marumoto et al. 2003), das die Ausbildung des Spindelapparates und dessen Stabilität reguliert. Diese Interaktion könnte möglicherweise auf einen weiteren Mechanismus hinweisen, durch den die FMNLs den Zellzyklus beeinflussen.

Anhand der Ergebnisse der therapeutischen Mausstudie vermuten wir, dass eine gewisse Schwelle von Aktinnukleatoren unterschritten werden muss, um einen starken proliferationshemmenden Effekt auf das Wachstum etablierter Tumore zu erzielen. Um diese These weitergehend zu untersuchen, sollte eine weitreichende Hemmung der DRFs in Tumorstudien erzielt werden, indem beispielsweise die FH2-Domäne als pharmakologisches Ziel in Betracht gezogen wird. Somit könnte geklärt werden, ob DRFs in Zukunft ein potenzielles Ziel in der Melanom-Therapie darstellen könnten.

Weiterhin sollte in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden, inwiefern der aufgrund der bisherigen Ergebnisse vermutete Zusammenhang zwischen MAL und den Forminen tatsächlich besteht. Anhand des Einflusses der kombinierten FMNL2- und FMNL3-Runterregulierung auf die MAL-Verteilung sowie der rettende Effekt von aktivem MAL auf den wachstumshemmenden Effekt einer FMNL-Runterregulierung legen bisher einen Zusammenhang dieser beiden Signalwege nahe. Zudem sollte in weiteren

Experimenten überprüft werden, ob eine MAL- oder SRF-Runterregulierung wie im Melanom auch in anderen Tumorentitäten einen hemmenden Effekt auf das Adhäsions-unabhängige Wachstum zeigt.

All diese Experimente würden einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der den beobachteten Effekten zugrunde liegenden zellulären Signalwege *in vitro* liefern. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft möglicherweise zur Entwicklung neuer Behandlungsansätze in der Therapie des malignen Melanoms sowie weiterer Tumorentitäten beitragen.

## Literaturverzeichnis

- Alberts, A. S. 2001. "Identification of a Carboxyl-Terminal Diaphanous-Related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain." *Journal of Biological Chemistry* 276 (4): 2824–30.
- Baarlink, C., Brandt, D., and Grosse, R.. 2010. "SnapShot: Formins." *Cell* 142 (1): 172.
- Baarlink, C., Wang, H., and Grosse, R. 2013. "Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL." *Science* 340 (6134): 864–67.
- Baker, J. M, and Boyce, F. M. 2014. "High-Throughput Functional Screening Using a Homemade Dual-Glow Luciferase Assay." *Journal of Visualized Experiments* no. 88.
- Begg, D. A., Rodewald, R., and Rebhun, L. I. 1978. "The Visulilzation of Actin Filament Polarity in Thin Sections. Evidence for the Uniform Polarity of Membrane-Associated Filaments." *Journal of Cell Biology* 79 (3): 846–52.
- Block, J. et al.. 2012. "FMNL2 Drives Actin-Based Protrusion and Migration Downstream of Cdc42." *Current Biology* 22 (11): 1005–12.
- Bretscher, A. 1981. "Fimbrin Is a Cytoskeletal Protein That Crosslinks F-Actin in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (11): 6849–53.
- Buchwalter, G., Gross, C., and Wasylyk, B. 2004. "Ets Ternary Complex Transcription Factors." *Gene* 324: 1–14.
- Bugyi, B., and Carlier, M.-F. 2010. "Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility Key Words." *Annu. Rev. Biophys* 39: 449–70.
- Carreira, S. et al. 2006. "Mitf Regulation of Dia1 Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness." *Genes and Development* 20 (24): 3426–39.
- Chen, B. et al. 2012. "BRAFV600E Negatively Regulates the AKT Pathway in Melanoma Cell Lines." *PLoS ONE* 7 (8): e42598.
- Cheng, L. et al.. 2011. "Aurora B Regulates Formin mDia3 in Achieving Metaphase Chromosome Alignment." *Developmental Cell* 20 (3): 342–52.
- Chesarone, M. A., DuPage, A. G., and Goode, B. L. 2010. "Unleashing Formins to Remodel the Actin and Microtubule Cytoskeletons." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (1): 62–74.
- Chhabra, E. S., and Higgs, H. N. 2007. "The Many Faces of Actin: Matching Assembly Factors with Cellular Structures." *Nature Cell Biology* 9: 1110–21.
- Colón-Franco, J. M., Gomez, T. S., and Billadeau, D. D. 2011. "Dynamic Remodeling of the Actin Cytoskeleton by FMNL1{gamma} Is Required for Structural Maintenance of the Golgi Complex." *Journal of Cell Science* 124: 3118–26.
- Conner, S. R., Scott, G., and Aplin, A. E. 2003. "Adhesion-Dependent Activation of the ERK1/2 Cascade Is By-Passed in Melanoma Cells." *Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34548–54.



- Copeland, J. W., Copeland, S. J., and Treisman, R.. 2004. "Homo-Oligomerization Is Essential for F-Actin Assembly by the Formin Family FH2 Domain." *Journal of Biological Chemistry* 279: 50250–56.
- Copeland, S. J. et al 2007. "The Diaphanous Inhibitory Domain/Diaphanous Autoregulatory Domain Interaction Is Able to Mediate Heterodimerization between mDia1 and mDia2." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (41): 30120–30.
- Derosier, D. J., Tilney, L. G., and Keck, W. M. 2000. "F-Actin Bundles Are Derivatives of Microvilli: What Does This Tell Us about How Bundles Might Form?" *The Journal of Cell Biology* 148 (1): 1–6.
- Descot, A. et al. 2009. "Negative Regulation of the EGFR-MAPK Cascade by Actin-MAL-Mediated Mig6/Errfi-1 Induction." *Molecular Cell* 35: 291–304.
- DeWard, A. D., and Alberts, A. S. 2008. "Microtubule Stabilization: Formins Assert Their Independence." *Current Biology* 18: R605–8.
- Ennen, M. et al. 2015. "Single-Cell Gene Expression Signatures Reveal Melanoma Cell Heterogeneity." *Oncogene* 34: 3251–63.
- Esnault, C. et al. 2014. "Rho-Actin Signaling to the MRTF Coactivators Dominates the Immediate Transcriptional Response to Serum in Fibroblasts." *Genes & Development* 28 (9): 943–58.
- Esue, O. et al. 2008. "The Filamentous Actin Cross-Linking/Bundling Activity of Mammalian Formins." *Journal of Molecular Biology* 384 (2): 324–34.
- Fackler, O. T., and Grosse, R. 2008. "Cell Motility through Plasma Membrane Blebbing." *The Journal of Cell Biology* 181 (6): 879–84.
- Faix, J., and Grosse, R. 2006. "Staying in Shape with Formins." *Developmental Cell* 10 (6): 693–706.
- Favaro, P. et al. 2006. "High Expression of FMNL1 Protein in T Non-Hodgkin's Lymphomas." *Leukemia Research* 30 (6): 735–38.
- Favaro, P. et al. 2013. "FMNL1 Promotes Proliferation and Migration of Leukemia Cells." *J. Leukoc. Biol* 3 (94): 503–12.
- Fletcher, D. A., and Mullins, R. D. 2010. "Cell Mechanics and the Cytoskeleton." *Nature* 463 (7280): 485–92.
- Friedl, P., and Wolf, K. 2009. "Plasticity of Cell Migration: A Multiscale Tuning Model." *J. Cell Biol* 188 (1): 11–19.
- Friedl, P., Zänker, K. S., and Bröcker, E.-B. 1998. "Cell Migration Strategies in 3-D Extracellular Matrix: Differences in Morphology, Cell Matrix Interactions, and Integrin Function." *Microsc. Res. Tech* 43: 369–78.
- Geneste, O., Copeland, J. W., and Treisman, R. 2002. "LIM Kinase and Diaphanous Cooperate to Regulate Serum Response Factor and Actin Dynamics." *The Journal of Cell Biology* 157 (5): 831–38.

- Giry, M. et al. 1995. "Transient Expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa Cells Potentiates Resistance to Clostridium Difficile Toxins A and B but Not to Clostridium Sordellii Lethal Toxin." *INFECTION AND IMMUNITY* 63 (10): 4063–71.
- Gomez, T. S. et al. 2007. "Formins Regulate the Actin-Related Protein 2/3 Complex-Independent Polarization of the Centrosome to the Immunological Synapse." *Immunity* 26: 177–90.
- Goode, B. L., and Eck, M. J. 2007. "Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly." *Annual Review of Biochemistry* 76: 593–627.
- Grbovic, O. M. et al. 2006. "V600E B-Raf Requires the Hsp90 Chaperone for Stability and Is Degraded in Response to Hsp90 Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (1): 57–62.
- Grikscheit, K. et al. 2015. "Junctional Actin Assembly Is Mediated by Formin-like 2 Downstream of Rac1." *The Journal of Cell Biology* 209 (3): 367–76.
- Gupton, S. L. et al. 2007. "mDia2 Regulates Actin and Focal Adhesion Dynamics and Organization in the Lamella for Efficient Epithelial Cell Migration." *Journal of Cell Science* 120 (Pt 19): 3475–87.
- Haass, N. K., Smalley, K. S., and Herlyn, M. 2004. "The Role of Altered Cell-Cell Communication in Melanoma Progression." *Journal of Molecular Histology* 35: 309–18.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5): 646–74.
- Harris, E. S. et al. 2006. "Mechanistic Differences in Actin Bundling Activity of Two Mammalian Formins, FRL1 and mDia2." *Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 14383–92.
- Harris, E. S. et al. 2010. "Assembly of Filopodia by the Formin FRL2 (FMNL3)." *Cytoskeleton* 67 (12): 755–72.
- Heath, J. P., and Dunn, G. A. 1978. "Cell to Substratum Contacts of Chick Fibroblasts and Their Relation to the Microfilament System. A Correlated Interference-Reflexion and High-Voltage Electron-Microscope Study." *Journal of Cell Science* 29: 197–212.
- Higgs, H. N., and Peterson, K. J. 2005. "Phylogenetic Analysis of the Formin Homology 2 Domain." *Molecular Biology of the Cell* 16: 1–13.
- Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R.. 1995. "The Rho Family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs Regulate Transcriptional Activation by SRF." *Cell* 81: 1159–70.
- Höbel, S. et al. 2010. "Polyethylenimine/small Interfering RNA-Mediated Knockdown of Vascular Endothelial Growth Factor in Vivo Exerts Anti-Tumor Effects Synergistically with Bevacizumab." *Journal of Gene Medicine* 12: 287–300.
- Holaska, J. M., Kowalski, A. K., and Wilson, K. L. 2004. "Emerin Caps the Pointed End of Actin Filaments: Evidence for an Actin Cortical Network at the Nuclear Inner Membrane." *PLOS Biology* 2 (9).

- Holmes, K. C. et al. 1990. "Atomic Model of the Actin Filament." *Nature* 347: 44–49.
- Ibrahim, A. F. et al. 2011. "MicroRNA Replacement Therapy for miR-145 and miR-33a Is Efficacious in a Model of Colon Carcinoma." *Therapeutics, Targets, and Chemical Biology* 71 (15): 5214–24.
- Ji, P., Jayapal, S. R., and Lodish, H. F. 2008. "Enucleation of Cultured Mouse Fetal Erythroblasts Requires Rac GTPases and mDia2 ." *Nature Cell Biology* 10 (3): 314–21.
- Kato, T. et al. 2001. "mDia1 Localization to Mitotic Spindle." *Journal of Cell Science* 114: 775–84.
- Katoh, M, and Katoh, M. 2003. "Identification and Characterization of Human FMNL1, FMNL2 and FMNL3 Genes in Silico." *International Journal of Oncology* 22: 1161–68.
- Kim, T., Cooper, J. A., and Sept, D.. 2010. "The Interaction of Capping Protein with the Barbed End of the Actin Filament." *Journal of Molecular Biology* 404: 794–802.
- Kitzing, T. M. et al. 2010. "Formin-like 2 Drives Amoeboid Invasive Cell Motility Downstream of RhoC." *Oncogene* 29 (16): 2441–48.
- Klein, R. M., and Aplin, A. E. 2009. "Rnd3 Regulation of the Actin Cytoskeleton Promotes Melanoma Migration and Invasive Outgrowth in Three Dimensions." *Cancer Research* 69 (6): 2224–33.
- Kovar, D, R. 2006. "Molecular Details of Formin-Mediated Actin Assembly." *Current Opinion in Cell Biology* 18: 11–17.
- Kuphal, S., Bauer, R., and Bosserhoff, A.-K. 2005. "Integrin Signaling in Malignant Melanoma." *Cancer and Metastasis Reviews* 24: 195–222.
- Lange, T. et al. 2014. "Aberrant Presentation of HPA-Reactive Carbohydrates Implies Selectin-Independent Metastasis Formation in Human Prostate Cancer." *Clin Cancer Res* 20 (7): 1791–1802.
- Le Clainche, C., and Carlier, M.-F. 2008. "Regulation of Actin Assembly Associated with Protrusion and Adhesion in Cell Migration." *Physiological Reviews* 88 (2): 489–513.
- Li, A. et al. 2012. "Activated Mutant NRas Q61K Drives Aberrant Melanocyte Signaling, Survival, and Invasiveness via a Rac1-Dependent Mechanism." *Journal of Investigative Dermatology* 132: 2610–21.
- Li, F., and Higgs, H. N. 2005. "Dissecting Requirements for Auto-Inhibition of Actin Nucleation by the Formin, mDia1." *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6986–92.
- Li, Y. et al. 2010. "FMNL2 Enhances Invasion of Colorectal Carcinoma by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition." *Molecular Cancer Research* 8(12): 1579–90.
- Liang, L. et al. 2013. "MicroRNA-137, an HMGA1 Target, Suppresses Colorectal Cancer Cell Invasion and Metastasis in Mice by Directly Targeting FMNL2." *Gastroenterology* 144 (3): 624–35.

- Liu, W. et al 2008. "Mechanism of Activation of the Formin Protein Daam1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (1): 210–15.
- Lu, G. et al. 2015. "MicroRNA-34a Targets FMNL2 and E2F5 and Suppresses the Progression of Colorectal Cancer." *Experimental and Molecular Pathology* 99: 173–79.
- Lynch, J. et al. 2013. "Metastasis Suppressor microRNA-335 Targets the Formin Family of Actin Nucleators." *PLoS ONE*.
- Mammoto, A. et al. 2004. "Role of RhoA, mDia, and ROCK in Cell Shape-Dependent Control of the Skp2-p27 kip1 Pathway and the G 1 /S Transition." *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26323–30.
- Marshall, J. F. et al. 1998. "Comparative Analysis of Integrins in Vitro and in Vivo in Uveal and Cutaneous Melanomas." *British Journal of Cancer* 77 (4): 522–29.
- Marumoto, T. et al.. 2003. "Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 278: 51786–95.
- Mattila, P. K., and Lappalainen, P. 2008. "Filopodia Molecular Architecture and Cellular Functions." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (6): 446–54.
- Medjkane, S. et al. 2009. "Myocardin-Related Transcription Factors and SRF Are Required for Cytoskeletal Dynamics and Experimental Metastasis." *Nature Cell Biology* 11: 257–68.
- Meerbrey, K. L. et al. 2001. "The pINDUCER Lentiviral Toolkit for Inducible RNA Interference in Vitro and in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (9): 3665–70.
- Mercher, T. et al. 2001. "Involvement of a Human Gene Related to the Drosophila Spen Gene in the Recurrent t(1;22) Translocation of Acute Megakaryocytic Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (10): 5776–79.
- Minin, A. et al. 2006. "Regulation of Mitochondria Distribution by RhoA and Formins." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 4): 659–70.
- Miralles, F. et al. 2003. "Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL." *Cell* 113 (3): 329–42.
- Nikkola, J. et al 2004. "Integrin Chains beta1 and Alphav as Prognostic Factors in Human Metastatic Melanoma." *Melanoma Research* 14: 29–37.
- Ohrnberger, S. et al. 2015. "Dysregulated Serum Response Factor Triggers Formation of Hepatocellular Carcinoma." *Hepatology* 61: 979–89.
- Oliver, T., Lee, J., and Jacobson, K.. 1994. "Forces Exerted by Locomoting Cells." *Seminars in Cell Biology* 5 (3): 139–47.
- Olson, E. N., and Nordheim, A.. 2010. "Linking Actin Dynamics and Gene Transcription to Drive Cellular Motile Functions." *Nature Reviews* 11: 353–65..

- Pawlowski, R. et al. 2010. "An Actin-Regulated Importin  $\alpha$ / $\beta$ -Dependent Extended Bipartite NLS Directs Nuclear Import of MRTF-A." *The EMBO Journal* 29: 3448–58.
- Pellegrin, S., and Mellor, H.. 2007. "Actin Stress Fibres." *Journal of Cell Science* 120: 3491–99.
- Pellegrin, S., and Mellor, H.. 2005. "The Rho Family GTPase Rif Induces Filopodia through mDia2." *Current Biology* 15 (2): 129–33.
- Phng, L.-K. et al 2015. "Formin-Mediated Actin Polymerization at Endothelial Junctions Is Required for Vessel Lumen Formation and Stabilization." *Developmental Cell* 32: 123–32.
- Plessner, M., and Grosse, R. 2015. "Extracellular Signaling Cues for Nuclear Actin Polymerization." *European Journal of Cell Biology* 94: 359–62.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. 2000. "Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29: 545–76.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. 2003. "Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments" *Cell* 112: 453–65.
- Provenzano, P. P., and Keely, P. J. 2011. "Mechanical Signaling through the Cytoskeleton Regulates Cell Proliferation by Coordinated Focal Adhesion and Rho GTPase Signaling." *Journal of Cell Science* 124 (Pt 8): 1195–1205.
- Pruyne, D. et al. 2002. "Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association." *Science* 297 (5581): 612–15.
- Rahman, M. A. et al. 2013. "B-Raf Mutation: A Key Player in Molecular Biology of Cancer." *Experimental and Molecular Pathology* 95 (3): 336–42.
- Ribas, A. 2015. "Releasing the Brakes on Cancer Immunotherapy." *New England Journal of Medicine* 373 (16): 1490–92.
- Ridley, A. J., and Hall, A. 1992. "The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors." *Cell* 70 (3): 389–99.
- Rizvi, S. A. et al. 2009. "Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Formin-Mediated Actin Assembly." *Chemistry & Biology* 16: 1158–68.
- Sanz-Moreno, V. et al. 2008. "Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement." *Cell* 135: 510–23.
- Schratt, G. et al. 2002. "Serum Response Factor Is Crucial for Actin Cytoskeletal Organization and Focal Adhesion Assembly in Embryonic Stem Cells." *The Journal of Cell Biology* 73714 (4): 21–9525.
- Schuster, I. G. et al. 2007. "Allorestricted T Cells with Specificity for the FMNL1-Derived Peptide PP2 Have Potent Antitumor Activity against Hematologic and Other Malignancies." *Blood* 110 (8): 2931–39.
- Schwartz, M. A., and K Assoian, R. K. 2001. "Integrins and Cell Proliferation." *Journal of Cell Science* 114: 2553–60.

- Shaposhnikov, D. et al.. 2013. "Myocardin Related Transcription Factors Are Required for Coordinated Cell Cycle Progression." *Cell Cycle* 1211: 1762–72.
- Sheppard, K. E., and Mcarthur, G. A. 2013. "The Cell-Cycle Regulator CDK4: An Emerging Therapeutic Target in Melanoma." *Clinical Cancer Research* 19 (19): 5320–28.
- Smalley, K. S. M. et al. 2005. "Up-Regulated Expression of Zonula Occludens Protein-1 in Human Melanoma Associates with N- Cadherin and Contributes to Invasion and Adhesion." *The American Journal of Pathology* 166: 1541–54.
- Sotiropoulos, A. et al. 1999. "Signal-Regulated Activation of Serum Response Factor Is Mediated by Changes in Actin Dynamics." *Cell* 98: 159–69.
- Stübke, K. et al. 2012. "Selectin-Deficiency Reduces the Number of Spontaneous Metastases in a Xenograft Model of Human Breast Cancer." *Cancer Letters* 321: 89–99.
- Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. 1999. "Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia." *The Journal of Cell Biology* 145 (5): 1009–26.
- Theriot, J. A. 1997. "Accelerating on a Treadmill: ADF/Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in the Dynamic Cytoskeleton." *The Journal of Cell Biology* 136 (6): 1165–68.
- Thies, A. et al. 2007. "Clinically Proven Markers of Metastasis Predict Metastatic Spread of Human Melanoma Cells Engrafted in Scid Mice." *British Journal of Cancer* 96 (4): 609–16.
- Thurston, S. F. et al. 2012. "The Ability to Induce Microtubule Acetylation Is a General Feature of Formin Proteins." *PLoS ONE*.
- Treisman, R., and Klug, A.. 1986. "Identification and Purification of a Polypeptide That Binds to the c-Fos Serum Response Element." *The EMBO Journal* 6 (9): 2711–17.
- Tseng, Y. et al. 2005. "How Actin Crosslinking and Bundling Proteins Cooperate to Generate an Enhanced Cell Mechanical Response." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (1): 183–92.
- Vaillant, D. C. et al. 2008. "Interaction of the N- and C-Terminal Autoregulatory Domains of FRL2 Does Not Inhibit FRL2 Activity." *Journal of Biological Chemistry* 283: 33750–62.
- Vega, F. M. et al. 2011. "RhoA and RhoC Have Distinct Roles in Migration and Invasion by Acting through Different Targets." *Journal of Cell Biology* 193 (4): 655–65.
- Vignjevic, D. et al. 2006. "Role of Fascin in Filopodial Protrusion." *Journal of Cell Biology* 174: 863–75.
- Wallar, B. J. et al. 2007. "RhoB and the Mammalian Diaphanous-Related Formin mDia2 in Endosome Trafficking." *Experimental Cell Research* 313 (3): 560–71.

- Wang, Y. et al. 2015. "Formin-like 2 Promotes b1-Integrin Trafficking and Invasive Motility Downstream of PKCa Developmental Cell Formin-like 2 Promotes b1-Integrin Trafficking and Invasive Motility Downstream of PKCa." *Developmental Cell* 34: 1–9.
- Wang, Z. et al. 2004. "Myocardin and Ternary Complex Factors Compete for SRF to Control Smooth Muscle Gene Expression." *Nature* 428 (6979): 185–89.
- Wellstein, A. et al. 1990. "Autocrine Growth Stimulation by Secreted Kaposi Fibroblast Growth Factor but Not by Endogenous Basic Fibroblast Growth Factor." *Cell Growth Differ.* 1 (2): 63–71.
- Werth, S. et al. 2006. "A Low Molecular Weight Fraction of Polyethylenimine (PEI) Displays Increased Transfection Efficiency of DNA and siRNA in Fresh or Lyophilized Complexes." *Journal of Controlled Release* 112: 257–70.
- Witke, W. 2004. "The Role of Profilin Complexes in Cell Motility and Other Cellular Processes." *Trends in Cell Biology* 14 (8): 461–69.
- Wozniak, Michele A, Katarzyna Modzelewska, Lina Kwong, and Patricia J Keely. 2004. "Focal Adhesion Regulation of Cell Behavior." *Biochimica et Biophysica Acta* 1692 (2-3): 103–19.
- Xu, Y. et al. 2004. "Crystal Structures of a Formin Homology-2 Domain Reveal a Tethered Dimer Architecture." *Cell* 116: 711–23.
- Yamana, N. et al. 2006. "The Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells through Mobilizing Apc and c-Src." *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6844–58..
- Yamashiro, S. et al. 2012. "Tropomodulins: Pointed-End Capping Proteins That Regulate Actin Filament Architecture in Diverse Cell Types." *Cytoskeleton* 69: 337–70.
- Yasuda, S. et al. 2004. "Cdc42 and mDia3 Regulate Microtubule Attachment to Kinetochores." *Nature* 428: 767–71.
- Zamir, E., and Geiger, B. 2001. "Molecular Complexity and Dynamics of Cell-Matrix Adhesions." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 20): 3583–90.
- Zeng, Y.-F. et al. 2015. "Increased Expression of Formin-like 3 Contributes to Metastasis and Poor Prognosis in Colorectal Carcinoma." *Experimental and Molecular Pathology* 98 (2): 260–67.
- Zheng, J. Q., Wan, J.-J., and Poo, M.-M. 1996. "Essential Role of Filopodia in Chemotropic Turning of Nerve Growth Cone Induced by a Glutamate Gradient." *The Journal of Neuroscience* 16 (3): 1140–49.
- Zhu, X. et al. 1996. "Adhesion-Dependent Cell Cycle Progression Linked to the Expression of Cyclin D1, Activation of cyclinE-cdk2, and Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein." *Journal of Cell Biology* 133 (2): 391–403.
- Zhu, X. L., Liang, L., and Ding, Y. Q.. 2008. "Overexpression of FMNL2 Is Closely Related to Metastasis of Colorectal Cancer." *International Journal of Colorectal Disease* 23 (11): 1041–47.

- Zhu, X.-L. et al. 2011. "FMNL2 Is a Positive Regulator of Cell Motility and Metastasis in Colorectal Carcinoma." *The Journal of Pathology* 224 (3): 377–88.
- Zigmond, S. H. et al. 2003. "Formin Leaky Cap Allows Elongation in the Presence of Tight Capping Proteins ." *Current Biology* 13: 1820–23.



## **Anhang**

### **Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Prof. Dr. Achim Aigner, Prof. Dr. med. Frank Czubayko, Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut, Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer, Prof. Dr. Jan Koolman, Prof. Dr. Roland Lill, Prof. Dr. Dominik Oliver, Prof. Dr. Tim Plant, Prof. Dr. Adriana del Rey, Prof. Dr. Klaus-Heinrich Röhm, Prof. Dr. Eberhard Weihe und PD. Dr. Reiner Westermann.

## Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Frank Czubayko für die Vergabe dieses interessanten Projekts bedanken. Für die Unterstützung, die Ratschläge und das in mich gesetzte Vertrauen bin ich sehr dankbar.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Achim Aigner, der mich nach meiner Diplomarbeit auch während meiner Doktorarbeit mit zahlreichen guten Ratschlägen und mit der Durchführung der Tierexperimente stark unterstützte.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Robert Grosse für seine fachliche Unterstützung sowie die Möglichkeit bedanken, ein Teil seiner Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Grosse gilt ebenfalls mein Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die konstruktiven Hinweise im Laboralltag sowie in den *Labmeetings*. Auch an gemeinsame Unternehmungen wie die regelmäßigen Grill-Partys oder die Ausflüge in den Kletterwald werde ich mich gern zurück erinnern.

Lieber Matthias, herzlichen Dank für deine unglaublich große Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen, für die Auswertung der FA-Fläche, die konstruktiven Diskussionen der Daten, deine Fahrdienste und das Korrekturlesen der Arbeit.

Auch dir, liebe Katharina, möchte ich an dieser Stelle für die Korrektur der Arbeit danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den Andrea Wüstenhagen, Marga Losekamp, Christiane Kleber und Kathrin Stelter für die zuverlässige Unterstützung im Labor, sei es durch die Pflege der Zellen, das Durchführen von Western Blots oder Plasmid-Präparationen. Die gemeinsamen Mittags- und Teepausen mit inspirierenden Rezeptideen und lustigen Anekdoten werde ich sehr vermissen.

Auch den vielen lieben Menschen und Freunden für's Leben, die ich in Marburg kennen gelernt habe, möchte ich von Herzen für die unzähligen schönen Stunden danken. Wenn es im Labor mal nicht so recht lief, hattet ihr immer ein offenes Ohr und konntet mich wieder aufmuntern.

Ganz besonders möchte ich jedoch meiner Familie und Sebastian für die uneingeschränkte Unterstützung danken. Ihr habt immer an mich geglaubt. Dafür danke ich euch!